



## 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공학박사학위논문

실규모 상향류식 유동상반응기에서  
탈질제한인자와 탈질균간의  
상관관계 연구

A study on the correlation between control factors  
and denitrifiers in a full-scale denitrifying upflow  
fluidized bed reactor (FBR)

2014년 8월

서울대학교 대학원  
지구환경시스템공학부  
김 주 성

# 실규모 상향류식 유동상반응기에서 탈질제한인자와 탈질균간의 상관관계 연구

지도교수 조 희 찬

이 논문을 공학박사 학위논문으로 제출함  
2014년 5월

서울대학교 대학원  
지구환경시스템공학부  
김 주 성

김주성의 박사 학위논문을 인준함  
2014년 6월

위 원 장 \_\_\_\_\_ (인)

부위원장 \_\_\_\_\_ (인)

위 원 \_\_\_\_\_ (인)

위 원 \_\_\_\_\_ (인)

위 원 \_\_\_\_\_ (인)

## 초 록

질소와 인은 부영양화의 원인물질로써 수중에 존재하는 과량의 질산성질소는 발암물질을 형성할 수 있고 아질산성질소와 함께 청색증을 유발하기도 한다.

2012년 이후 총인이 하천에 유입되는 것을 방지하기 위해 대부분의 하수종말처리시설에 대해 총인을 0.2mg/L 이하로 배출하도록 기준을 강화하였다. 하지만 고도처리 시설을 설치하였음에도 불구하고 조류 주의보는 2013년 이후에도 계속 발령되었으며 정부는 이러한 부영양화 문제를 해결하기 위해 공공하수처리시설에 대해 2012년부터 계절과 지역에 관계없이 총질소 배출허용기준을 20mg/L 이하로 강화하였다.

일반적인 하·폐수의 질소제거 방법으로는 물리화학적 처리방법과 생물학적 처리방법이 있다. 물리화학적 처리는 처리효율이 일정하고 폐수 내 독성물질 등이 존재하더라도 처리가 가능한 장점이 있는 반면 전기화학적인 방법을 이용하거나 염화아연, 알루미늄파우더 등을 이용하기 때문에 생물학적 처리보다 비용이 많이 들고 운영·관리하는 측면에서는 특별한 지식을 요구하는 경우가 많아 적용이 제한적일 수 있다.

생물학적 질소제거는 종속영양미생물을 이용하는 방법과 독립영양미생물을 이용하는 방법으로 나눌 수 있는데 우리나라의 하수처리장에서는 대부분 종속영양미생물을 이용한 탈질 방법을 사용하고 있다. 종속영양 탈질은 호기성 미생물을 이용하여 암모니아를 질산성질소로 산화시킨 후, 메탄올, 에탄올 등과 같은 유기탄소원을 주입하여 혐의성 미생물로 탈질하는 방법이다.

본 연구의 상향류식 유동상반응기는 총인 제거를 위하여 전국 하수처리장 50여 곳에 설치되었으며 기 설치된 상향류식 유동상반응기



로 총인뿐만 아니라 총질소도 안정적으로 처리할 수 있다면 비용 경제적인 접근방법일 것이다. 따라서 본 연구에서는 상향류식 유동상반응기를 이용하여 총질소를 처리할 수 있는 지를 판단하고 최적의 운전인자를 도출하는 데 목적을 두었다. 이를 위해 첫째, 온도와 탈질효율간의 상관관계를 분석하였고 둘째, 메탄올 주입량과 탈질효율간의 상관관계를 분석하여 최적의 메탄올주입량(C/N ratio)을 도출하였으며 셋째, 실용적인 관점에서 메탄올 주입 전 유입수의 용존산소 상한을 분석하였다. 넷째, 용존산소와 온도가 변화될 때 우점하는 미생물 종이 어떻게 변화하는지 상호관계를 분석하였다.

이를 위해 실험규모의 파일럿플랜트(Pilot plant)를 하수처리장에 설치하여 운영하였으며 수질항목 조사분석은 COD<sub>Mn</sub>을 standard methods(APHA, AWWA and WPCF, 1995)로 분석하였고 유량은 on-line 자동측정기인 Green Flowmeter SSM100(SSMI, Korea), 질산성질소는 HACH DR890(HACH Co, USA)과 on-line 자동측정기인 NITRATAX plus(HACH Co, USA)를 사용하였으며, 용존산소는 HACH 200<sup>TM</sup> Universal Controller(HACH Co, USA)를 사용하였고 온도(T)는 하수처리장의 TMS(Telemetering system) 방류수질 자료를 사용하였다. 또한 미생물의 분석은 16S rRNA 기법을 사용하였다.

경험적 온도상수  $\theta$ 는 1.165였으며 C/N비 ( $\text{COD}_{\text{closed}}/\text{NO}_3^- - \text{N}_{\text{removed}}$ )는 메탄올을 기준으로 4.65였다. 또한 메탄올 주입 전 유입수의 용존산소 상한은 1.9mg/L였다. 용존산소와 온도가 변화하면 우점하는 미생물 종이 어떻게 변화하는지 상호 연관관계를 분석한 결과, 발견한 중요 미생물은 저온 탈질미생물인 Flavobacteriales와 미세산소조건(Micro-aerobic condition)에서 불완전한 탈질을 하는 *Methylothermobacter*와 *Methylothermobacter mobilis*로 밝혀졌다.

본 연구의 결과는 총질소 제거 등의 수질개선 및 하천의 유지용수 등으로 충분히 활용 가능한 수질을 확보할 수 있는 기술적인 정보를 제공하여 생태계를 안정시키는데 기여할 것이다. 또한 총인처리를 목적으로 전국 하수처리시설에 기 설치되어 있는 상향류식 유동상반응기로 총질소도 처리할 수 있게 함으로써 오염물질 처리대상을 확장함은 물론 필수적인 운전조건을 제공하여 설비운영에 용이성과 경제성을 부여하기를 기대한다. 더욱이 실규모 반응기에서 분석했기 때문에 실용적이며 현장 적용을 쉽게 할 것으로 판단된다. 마지막으로 본 연구에서 수행한 운전조건 변화와 미생물 우점종간의 상호관계는 특정 증식환경에 적합한 미생물을 집중적으로 배양할 수 있는 단초가 되기를 기대한다.

주요어 : 탈질 제한인자, 상향류식 유동상반응기, *Flavobacteriales*, *Methylothera spp.*, 미세산소상태 (Micro-aerobic condition)

학 번 : 99411-803

# 목 차

1. 서 론 .....	1
1.1. 연구배경 .....	1
1.2. 연구목적 .....	7
2. 이론적 배경 .....	11
2.1. 생물학적 탈질 공정 .....	11
2.1.1. 독립영양 탈질 공정 .....	11
2.1.2. 종속영양 탈질 공정 .....	12
2.1.3. 충전상 생물막 공정 .....	17
2.2. 탈질 이론 및 제한인자 .....	21
2.2.1. 탈질 양론 .....	21
2.2.2. C/N비 .....	28
2.2.3. 온도 .....	30
2.2.4. 용존산소 .....	32
2.3. 탈질 미생물과 우점도 .....	35
2.3.1. 주요 탈질 미생물 .....	35
2.3.2. 우점도 분석 이론 .....	39

<b>3. 재료 및 방법</b>	<b>49</b>
3.1. 반응기 구성과 운전	51
3.1.1. 상향류식 유동상반응기 구성	51
3.1.2. 상향류식 유동상반응기 운전원리	55
3.2. 실험방법	58
3.2.1. 실험단계 분류	58
3.2.2. 운전 조건	59
3.3. 분석방법	62
3.3.1. 제한인자 분석	62
3.3.2. 우점도 분석	63
 <b>4. 상향류식 유동상반응기에서 제한인자와 탈질효율</b>	 <b>67</b>
4.1. 최적 C/N비	67
4.2. 온도	69
4.3. 유입 용존산소 상한	72
4.4. 결론	76
 <b>5. 상향류식 유동상반응기에서 제한인자와 탈질균</b>	 <b>78</b>
5.1. 생활성 평가 및 T-RFLP 분석	78
5.1.1. 생활성도 평가	78
5.1.2. T-RFLP 분석	80
5.2. 우점도 및 생화학적 특성	82

5.2.1. 실험단계별 우점도 .....	85
5.2.2. 미생물의 생화학적 특성 .....	93
5.2.3. 탈질 우점균 .....	96
5.3. 제한인자와 탈질 우점균의 상관관계 분석 .....	98
5.3.1. 온도와 탈질 우점균의 상관관계 .....	98
5.3.2. 용존산소와 탈질 우점균의 상관관계 .....	100
5.4. 결론 .....	104
 6. 결 론 .....	 107
 참 고 문 헌 .....	 111
 Abstract .....	 125
 Appendix .....	 130

## 표 목 차

Table 1-1. The standards of the quality of the effluent water discharged from sewage treatment plant on SAWERAGE ACT in Korea .....	2
Table 1-2. Processes of denitrification and dephosphorus	4
Table 2-1. Relative merits and demerits for processes of denitrification and dephosphorus .....	13
Table 2-2. Comparison of alternative carbon sources in post-denitrifying MBBRs .....	29
Table 2-3. Values for Arrhenius temperature coefficients	30
Table 2-4. Permissible DO concentrations for denitrification .....	34
Table 2-5. Organisms performing various activities in nitrogen cycle .....	36
Table 2-6. Primers for live/dead cell staining .....	41
Table 3-1. Water quality of the effluent discharged from C sewage treatment plant .....	50
Table 3-2. Specification of the full-scale FBR .....	52
Table 3-3. Media Specitication of the full-scale FBR .....	53
Table 3-4. phases based on temperature .....	59
Table 3-5. Operating condition of the full-scale FBR .....	61

Table 3–6. 16S rRNA analysis used in this study .....	66
Table 4–1. C/N ratio and SDNR <sub>max</sub> on each phase .....	68
Table 4–2. Temperature of influent waste water .....	69
Table 4–3. DO and NO <sub>3</sub> <sup>–</sup> –N of influent waste water .....	72
Table 4–4. DO of influent waste water and SDNR .....	74
Table 4–5. C/N ratio and DO <sub>max</sub> on each phase .....	75
Table 5–1. Phylogenic information of OTUs .....	84
Table 5–2. Bacterial community structure of the methylotrophic denitrification consortium in phase I .....	86
Table 5–3. Bacterial community structure of the methylotrophic denitrification consortium in phase II .....	89
Table 5–4. Bacterial community structure of the methylotrophic denitrification consortium in phase III .....	91
Table 5–5. Denitrifiers and Methylophilales found in FBR 97	
Table 5–6. Relative abundance of denitrifiers and Methylophilales on temperature in each phase	99
Table 5–7. Relative abundance of denitrifiers and Methylophilales on influent DO in each phase .....	101

## 그 립 목 차

Fig. 1-1. Flowchart of this study .....	10
Fig. 2-1. A <sub>2</sub> O process .....	14
Fig. 2-2. Bardenpho process .....	15
Fig. 2-3. UCT and Modified UCT process .....	16
Fig. 2-4. Use of the electron doner for energy production and cell synthesis .....	22
Fig. 2-5. Correlation between denitrification rate and temperature .....	32
Fig. 2-6. Nitrogen cycle .....	36
Fig. 2-7. The principle of PCR .....	42
Fig. 2-8. The process of T-RFLP analysis .....	44
Fig. 2-9. The process of clone library .....	46
Fig. 2-10. Sequencing by Sanger methods .....	46
Fig. 2-11. Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences at phase I .....	48
Fig. 3-1. Piping & instrument diagram of the full-scale FBR .....	51
Fig. 3-2. Connected FBR with C sewage treatment plant	54
Fig. 3-3. Picture of the full-scale FBR .....	55
Fig. 3-4. Schematic diagram of FBR .....	57
Fig. 3-5. Flow rate of influent waste water in this study	60



Fig. 3-6. Head loss and HRT of FBR in this study .....	62
Fig. 4-1. Dosed CODMeOH and C/N ratio of FBR in this study .....	68
Fig. 4-2. SDNR with temperature of FBR in this study ..	69
Fig. 4-3. Correlation between temperature and SDNR in the methanol dosed by formula 2-21 .....	71
Fig. 4-4. Influent and effluent DO of FBR in this study ..	73
Fig. 4-5. Influent and effluent $\text{NO}_3^-$ -N of FBR in this study .....	73
Fig. 4-6. Comparison the temperature correction factor( $\theta$ ) in this study and the others .....	77
Fig. 5-1. Results of Live/dead cell staining in this study	79
Fig. 5-2. Results of 27F-FAM analysis in this study .....	81
Fig. 5-3. Results of 518R-HEX analysis in this study ..	81
Fig. 5-4. Bacterial community structure of the methylotrophic denitrification consortium on phylum/class levels and order level in phase I .....	87
Fig. 5-5. Bacterial community structure of the methylotrophic denitrification consortium on phylum/class levels and order level in phase II .....	90
Fig. 5-6. Bacterial community structure of	

the methylotrophic denitrification consortium on phylum/class levels and order level in phase III	92
Fig. 5–7. Denitrifiers and Methylophilales to be or not on temperature in each phase	99
Fig. 5–8. Denitrifiers and Methylophilales to be or not on influent DO in each phase	102
Fig. a–1. Phylogenetic tree of $\alpha$ –proteobacteria at phase II	130
Fig. a–2. Phylogenetic tree of Methylophilales group of $\beta$ –proteobacteria at phase II	131
Fig. a–3. Phylogenetic tree of the group without Methylophilales in $\beta$ –proteobacteria at phase II	132
Fig. a–4. phylogenetic tree of $\gamma$ –proteobacteria at phase II	133
Fig. a–5. Phylogenetic tree of $\delta$ –proteobacteria at phase II	133
Fig. a–6. Phylogenetic tree of Bacteroidetes phylum at phase II	134
Fig. a–7. Phylogenetic tree of Chloroflexi Phylum at phase II	135
Fig. a–8. Phylogenetic tree of Nitrospirae and Deinococcus phylum at phase III	135

# 1. 서 론

## 1.1. 연구배경

질소는 자연생태계에 없어서는 안 될 중요한 순환자원이며 영양소의 한가지이다. 급격한 인구집중, 도시화와 산업발달로 인해 질소와 인을 함유한 오염물질이 특정 수계와 유역에 집중되어 환경문제를 야기하고 있다. 질소와 인이 생태계의 자정한계를 초과해서 유입되면 플랑크톤의 번성 및 성장을 초래한다(An KG et al., 2000). 플랑크톤이 이상 증식된 물에서는 악취가 나고, 탁도가 높아지며 용존산소가 고갈되어 수중 생물들을 죽음에 이르게 한다. 우리나라는 해마다 여름이면 주요 하천이나 댐에서 부영양화 현상이 주기적으로 발생하고 있다. 또한 부영양화 원인물질인 질산성질소는 발암물질인 nitrosoamine을 형성할 수 있고 아질산성질소와 함께 사람의 혈액 내의 헤모글로빈을 산화시켜 산소 전달을 방해하는 청색증(methemoglobinemia)을 유발하기도 한다(<http://en.wikipedia.org/wiki/Methemoglobinemia>).

우리나라는 이러한 수질오염문제를 해결하기 위하여 1966년에 하수도법을 제정한 이후 오염 현안과 현상을 반영하여 최근까지 개정해 오고 있다. 근래에 정부는 질소와 인으로 인해 발생하는 환경문제를 인지하고 기존의 배출허용기준 항목인 BOD, COD, SS 등의 유기물 중심 규제에 더하여 영양염류 항목을 추가하고, 2001년 말에 총인·총질소의 배출허용기준 강화를 목적으로 하수도법 시행규칙 제6조 제1항을 신설하였다.

총질소 배출허용기준을 보면 2012년까지는 동절기에 수온이 낮아 탈질이 원활하지 못한 기술적인 문제 때문에 지역별로 60mg/L이하로 기준을 완화·적용해 왔으나 2012년부터는 하수처리용량이 500m<sup>3</sup> 이상인 공공하수처리시설의 방류수 총질소 농도를 계절과 지역에 관계없이 20mg/L 이하로 규제기준을 강화하였다(환경부, 2012; Table 1-1). 또한 2015년부터는 1일 하수처리용량이 500m<sup>3</sup> 미만인 경우도 총질소를 20mg/L 이하로 처리하여 배출하여야 한다.

Table 1-1. The standards of the quality of the effluent water discharged from sewage treatment plant on SAWERAGE ACT in Korea

연도 및 지역	BOD (mg/L)	COD <sub>Mn</sub> (mg/L)	SS (mg/L)	T-N (mg/L)	T-P (mg/L)	E-C (개/L)	TU
~ '95	30 이하	50 이하	70 이하	—	—	—	—
'96 ~ '99	20 이하	40 이하	20 이하	60 이하	8 이하	—	—
'00 ~ '01	특별대책지역 잡설수중보권역	10 이하	40 이하	10 이하	20 이하	2 이하	—
	기타지역	20 이하	40 이하	20 이하	60 이하	8 이하	—
'02 ~ '07	특정지역 기준	10 이하	40 이하	10 이하	20 이하	2 이하	3,000 이하
	기타지역 기준	20 이하	40 이하	20 이하	60 이하	8 이하	—
'08 ~ '11	10 이하	40 이하	10 이하	20 이하	2 이하	3,000 이하	1
	I 지역	5 이하	20 이하	10 이하	20 이하	0.2 이하	1,000 이하
'12 ~	II 지역	5 이하	20 이하	10 이하	20 이하	0.3 이하	1
	III 지역	10 이하	40 이하	10 이하	20 이하	0.5 이하	3,000 이하
	IV 지역	10 이하	40 이하	10 이하	20 이하	2 이하	

하·폐수의 질소제거 방법으로는 물리화학적 방법과 생물학적 방법이 있다. 물리화학적인 방법에 대한 연구는 공기 탈기(air stripping), 파괴점 염소주입(breakpoint chlorination), 선택적 이온교환(selective ion exchanger), 화학적 환원, 전기투석, 화학적 침전 등이 있다. 물리화학적 처리는 생물학적 처리방법에 비해 처리효율이 일정하고 폐수 내에 독성물질이 존재하더라도 처리가 가능하다는 장점이 있는 반면, 전기와 같은 에너지를 사용하거나 염화아연, 알루미늄파우더 등과 같은 화학물질을 이용하기 때문에 생물학적 방법보다 비용이 많이 들고 특별한 지식을 요구하는 경우가 많다.

최근 생물학적인 질소제거 방법에 대한 연구는 ANAMMOX(anaerobic ammonia oxidation), 독립영양 탈질, 종속영양 탈질 등이 있다. ANAMMOX 공정은 기존에 있던 생물학적 질소 순환 이론을 깨는 것으로서 혐기조건에서 아질산염을 전자 수용체로 하여 암모늄 이온을 질소가스로 전환하는 생화학 과정이 1941년 바다에서 발견되면서 시작되었다(Dalsgaard et al, 2005). Mulder(1987)가 탈질 파일럿 반응조에서 질산염이 존재하는 상태에서 암모늄이온이 없어지는 현상을 확인하고 이를 ANAMMOX라고 명명하였고, Kuenen(2008)은 이 반응을 과학적으로 증명하였다. ANAMMOX는 암모늄 이온을 질소가스로 바로 전환할 수 있는 장점에도 불구하고 온도조건, 용존산소 민감성 등으로 인해 실용화에는 시간이 필요할 것으로 사료된다. 독립영양탈질은 국내외에서 주로 황(S)을 이용한 탈질 방법이 연구되고 있다(Ahmed et al, 2012). 그러나 종속영양탈질에 비해 경제적인 방법이지만 고농도 질산성질소에 대한 처리능력(Capacity)의 한계, 장치가 막히고 pH가 저하되는 등의 문제가 있어 연구소와 학계를 중심으로 이를 개선하려는 연구가 계속되고 있다(김인수, 2001; Moraes et al., 2012).

중속영양탈질은 호기성 미생물을 이용하여 암모니아를 질산성질소로 산화시킨 후(nitrification), 메탄올, 에탄올 등과 같은 외인성 유기탄소원을 주입하여 혐의성 미생물로 탈질한 후, 질소가스로 배출하는 방법이며 가장 많이 적용되고 있는 방법이다. 중속영양 탈질 공정은 무산조의 위치에 따라 전탈질과 후탈질 공정으로 분류된다. 전탈질 공정은 폐수내의 유기물을 탄소원으로 사용하여 질소를 제거하는 공정으로서 전형적인 Modified Bardenpho, AO, A<sub>2</sub>O, Phostrip, UCT 공정이 있으며 이들을 변형한 DNR(Daewoo nutrient removal) process, STAR(Samsung tetra a reactor) process, HBR process((주)한미), HDF process(한화), SDPRS(SK) 등이 있다(Table 1-2).

Table 1-2. Processes of denitrification and dephosphorus

type	process name
A <sub>2</sub> O	DNR, HDF, HIBNR, DBS, P/L II, MLE, A <sub>2</sub> O, BNR, PID, Anaerobic & Aerobic(STEP type Anaerobic & oxic, Two Anaerobic & oxic), Long aeration with intermittent discharge, CSBR, Bio-NET, VIP, MUCT, POBR, Bardenpho, PADDO, DASPro, KHBNR, Den & P, HNR, Phostrip II, KSBNR, STAR, TEC-BNR, SENS, KNR, A2O2, ASA, AO, AOSB, SAMCO, MS-BNR, DeNiPho(Catalytic oxidation with intermittent aeration )
MEDIA	BIO-SAC BNR, BIOFIL, NPR, CNR, HINT, MPM Phosphates Recovery Process, RID & inner cycle denitrification, SWPP(Tertiary catalytic oxidation), Ciliary media, HYDEN, Coating microorganism contact treatment, HFBF, SDPR, SM, SBAF
SBR	PSBR, MSBR(Aqua), BIOGEST-SBR, KIDEA(CSTR active sludge, ICEAS, CASS, BCS, NAM, Omniflo, Air-vent SBR, Fluidyne, TSBR
others	ACS, BCF, BSTS-II, Coagulant cycle, Pure O <sub>2</sub> aeration, HBR-II, B <sub>3</sub> , KOMIAE, NAP, NPTS, Seil, HANT, OSAWA, Bio-Combinator, Biofor, Biostyr, S-BC, e-BNR, Azenit-P, ODIS, SBF, PhiCD, Symbio, RBC and others

대규모 하수처리장의 경우에는 Table 1-2의 연속 흐름식 공정이 적용되고 있으나 공정에 따라 2~5개 이상의 독립적인 반응조와 말단의 침전조를 설치해야 하기 때문에 넓은 부지가 필요해서 중소규모의 고도처리에는 적합하지 않다. 따라서 중소규모 하수처리장에는 유입유량의 탄력적인 대응을 목적으로 SBR(Sequencing Batch Reactor)기술이 많이 적용되고 있다. 그러나 이 공정들은 미생물과 처리수의 고액분리를 중력 침강으로 하기 때문에 미생물의 농도를 높게 유지하기가 어려우며, 유입부하가 갑작스럽게 변동되면 미생물이 유실되어 효율적인 처리가 어려울 수 있다. MBR(Membrane Bio-reactor)은 작은 규모에서도 경제적이고 자동화가 용이하며 운전이 간편하고 높은 처리 효율을 보이기 때문에 소규모 하수처리장에 적합하지만 막의 오염으로 인한 성능저하 때문에 성능 회복을 위해서 주기적으로 세척하거나 막을 교체해야 하는 문제가 있을 수 있다.

반면 상향류식 유동상반응기는 다른 시스템에 비해 수리학적 체류시간이 훨씬 짧아서 작은 규모로도 대용량의 하·폐수를 처리할 수 있으며 설치부지와 증설비용이 작고 여재 교체도 불필요하기 때문에 경제적이다. 탈질에 소요되는 수리학적 체류시간은 A<sub>2</sub>O공정 1~2.5hr, 5단 Bardenpho공정 5~10hr, UCT공정 5~10hr 그리고 VIP공정 2~4hr이다(환경부, 2005). 이에 비하여 상향류식 유동상반응기는 10분 이내에 처리가 가능하다고 보고된 바 있다(Bruce E. Rittman et al., 2002). 상향류식 유동상반응기는 연속완전혼합조와 같은 환경을 제공하기 위해 여재를 강제로 순환시키는 방법(Brito, A.G. et al., 1997)을 사용하는데 순환과정에서 미생물의 부착과 탈착을 반복하고, 느린 속도로 침전하면서 2차 처리수와 접촉하기 때문에 미생물과 하수사이의 접

촉면적을 최대로 높이는 시스템이다(Lettinga et al., 1991). 따라서 기존 응집 설비에 비하여 적은 약품량과 외인성 유기탄소원으로도 총인·총질소 처리가 가능할 것으로 생각된다. 이러한 내부순환방법의 장점때문에 UASB(Nicolella, C., 2000)나 ANAMMOX에서도 미생물과 하수의 접촉면적을 증가시키기 위해 상향류식 유동상반응기를 사용하기도 한다(Chen et al., 2011).

이러한 장점들로 인해 국내에는 상향류식 유동상반응기가 총인 제거를 목적으로 50여 곳의 하수처리장에 설치되었거나 설치될 예정이다. 따라서 공공하수처리장에 기 설치된 상향류식 유동상반응기로 총인 뿐만 아니라 총질소도 안정적으로 처리한다면 경제적인 것이다. 우리나라에서는 상향류식 유동상반응기를 질소제거에 사용한 적이 없으나, 이미 미국에서는 full-scale로 적용하고 있다(US EPA, 2010b). 이에 본 연구에서는 pilot scale의 상향류식 유동상반응기를 이용하여 종속영양 탈질 가능 여부를 확인하고, 특히 탈질 제한인자와 미생물 분석을 통해 탈질 최적조건을 도출하고자 하였다.



## 1.2. 연구목적

질소처리를 위해 상향류식 유동상반응기를 생물학적으로 이용하려면 미생물의 증식환경에 대한 분석이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 상향류식 유동상반응기의 생물학적 탈질 가능성 확인뿐 아니라 운전요소를 최적화하고자 하였다. 이에 따라 실험규모의 상향류식 유동상반응기(FBR, Fluidized Bed Reactor)를 경기도 용인 C하수처리장에 설치하였다.

탈질효율은 온도와 비례한다. 동절기에 하수의 온도조건을 20℃ 이상으로 유지하려면 에너지를 사용할 수밖에 없어 비용문제를 초래한다. 저온의 영향을 상쇄할 수 있는 방법으로는 운전요소 변경, 체류시간 연장, 저온탈질균 투입 등이 있을 수 있다. 이를 판단하기 위해서 온도와 탈질효율간의 상관관계 분석을 첫 번째 목적으로 하였다.

하수처리시설의 2차 처리수에는 탈질미생물이 섭취할 수 있는 유기탄소원이 부족하다. 탈질에 관여하는 종속영양 미생물들에게 전자공여체로서 외인성 유기탄소원을 주입해 주어야 할 필요가 있다. 외인성 유기탄소원으로는 주로 메탄올, 에탄올, 아세트이트 등을 사용한다. 하수처리장에서는 질산성질소 제거효율과 경제적인 측면에서 3차 고도처리(tertiary treatment)에 주로 메탄올을 사용하고 있다(Jeong et al., 2006). 메탄올을 이용하는 가장 큰 이유는 다른 탄소원에 비해 저가이기 때문에 운영비용을 감소시킬 수 있다. 따라서 상향류식 유동상반응기에서 메탄올 주입량과 탈질효율(SDNR, specific denitrification ratio)간의 상관관계를 분석하여 최적의 메탄올주입량(C/N ratio) 도출을 두 번째 목적으로 하였다.

또한 용존산소는 대표적인 탈질 제한인자이다. 지금까지 대부분의 연구가 반응기 내부 용존산소 상태를 다루고 있으나 본 연구에서는

실용적인 관점에서 메탄올 주입 전 유입수의 용존산소 상한을 분석하는 것을 세번째 목적으로 하였다.

현재까지 환경공정의 해석은 주로 운전요소와 제한인자의 인위적 또는 비인위적 변화에 의한 처리효율과의 상관성 분석에 집중해 왔다. 또한 미생물에 관한 생물학적, 생태학적 연구가 진행되었다 하더라도 실험실규모에 머무르고 있을 뿐만 아니라(Baytshtok et al., 2008; 2009), 메탄올을 이용하는 탈질미생물의 기능과 유전학적 특성에 집중되어 있어(Chistoserdova, 2011) 탈질조건과 메탄올 이용 탈질 미생물 간 상호관계에 관한 연구는 부족한 실정이다.

복잡한 탈질 메커니즘에서 미생물 증식환경이 변화함에 따라 메탄올이용 탈질 우점 미생물 군집 내에 존재하는 각각의 종도 변화할 것이다. 따라서 미생물종을 중심으로 생물학적 탈질효율을 증대시킬 수 있는 단초를 마련하기 위해 용존산소와 온도가 변화하면 우점하는 미생물 종이 어떻게 변화하는지 상호 연관관계를 분석하는 것을 네 번째 목적으로 하였다.

이를 위한 본 연구의 방법을 요약하면 먼저 상향류식 유동상반응기 운전 시 변화를 줄 수 있는 운전요소(control factor), 외부적인 환경요인으로 변화를 줄 수 없는 항목(external fixed factor) 그리고 물리적인 환경과 관련된 항목(physical condition)으로 나누었다(Fig. 1-1).

운전요소는 용존산소, 외인성 유기탄소원주입량 그리고 질산성질소 부하량 등이고, 외부적으로 결정되어 반응기에 절대적인 영향을 미치는 인자(external fixed factor)는 온도로 구분하였다. 또한 반응기와 관련한 물리적인 조건 항목으로는 유입유량(flow rate), 반류유량(reject flow rate), 여재의 순환율(turn over rate)로 분류하였다.

유입구(inlet)과 유출구(outlet)에서 각각 시료를 채취하여 질산성 질소, 용존산소, 화학적산소요구량(COD) 등의 수질을 파악하고 온도와 용존산소 등은 현장에서 측정하였다.

그리고 미생물 분석용 시료를 채취하여 DNA를 추출(extraction)하고 배양하여 중합효소연쇄반응(PCR-Polymers chain reaction)으로 증폭(amplification)한 후 염기서열을 분석(sequencing)하였다. 분석 결과로 계통학적 분류도(phylogenetic tree)를 작성하였다. 각각의 염기서열을 유전자정보 DB와 비교하여 유사도(similarity) 97% 이상의 OTUs (operational taxonomic units) 만을 NCBI (National Center for Biotechnology Information)에 등록하고, EzTaxon server에서 이들의 생화학적 특성을 조사하였다.

끝으로 제한인자와 수질자료를 분석하여 최적의 운전조건을 도출한 후, 미생물 정보와 비교·분석하여 상호 연관관계를 밝혔다.

본 연구의 결과는 수질개선 및 하천의 유지용수 등으로 충분히 활용 가능한 수질을 확보할 수 있는 기술적인 정보를 제공하여 생태계를 안정시키는데 기여할 것이다. 또한 총인처리를 목적으로 전국 하수처리시설에 설치되어 있는 상향류식 유동상반응기로 총질소도 처리할 수 있게 함으로써 오염물질 처리대상을 확장함은 물론 필수적인 운전조건을 제공하여 설비운영에 용이성과 경제성을 부여하기를 기대한다. 더욱이 실규모 반응기에서 분석했기 때문에 실용적이며 현장 적용을 쉽게 할 것이다. 마지막으로 본 연구에서 수행한 운전조건 변화와 미생물 우점종간의 상호관계는 특정 증식환경에 적합한 미생물을 집중적으로 배양할 수 있는 단초가 되기를 기대한다.

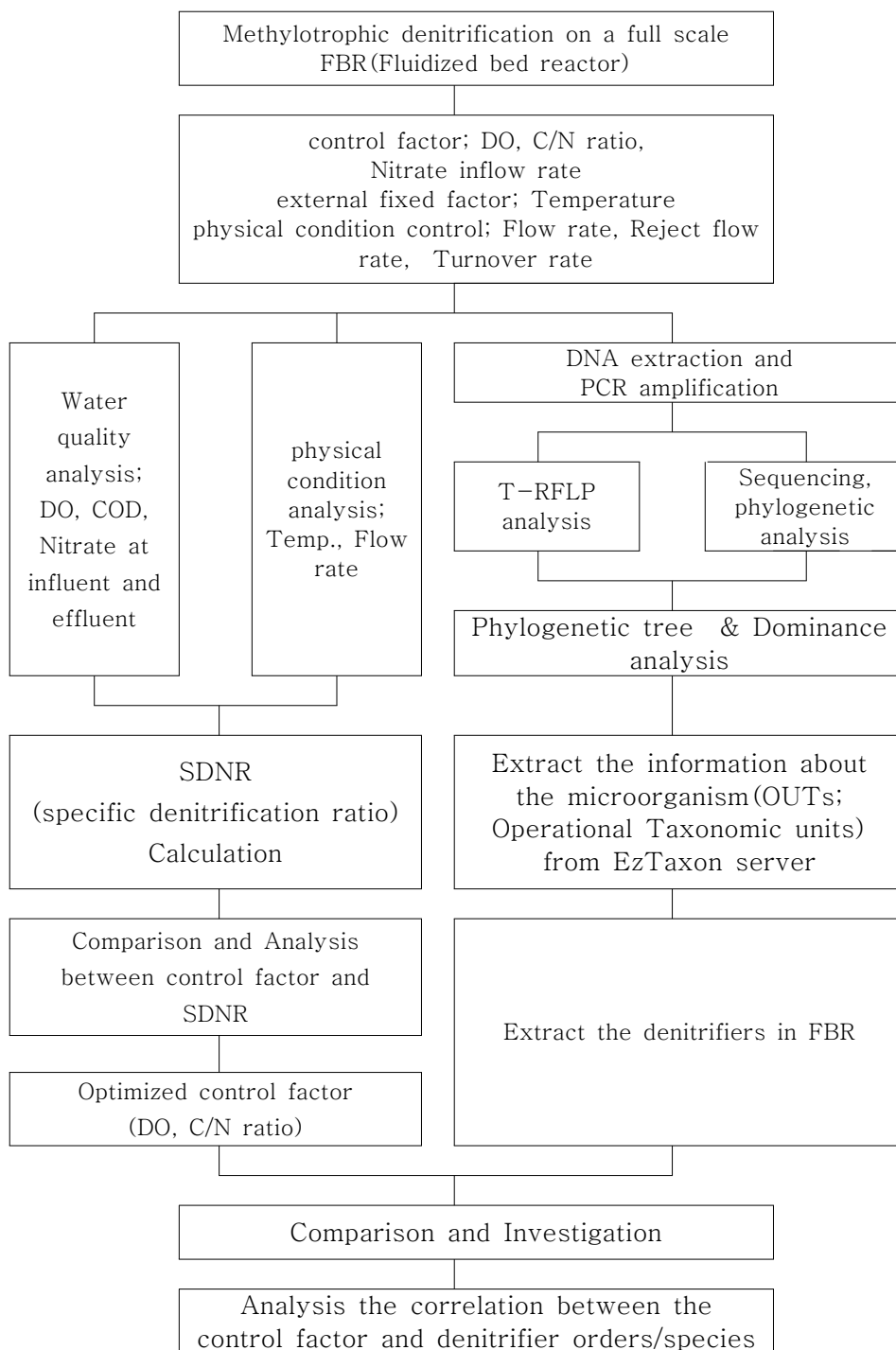


Fig. 1-1. Flowchart of this study

## 2. 이론적 배경

### 2.1. 생물학적 탈질 공정

#### 2.1.1. 독립영양 탈질 공정

축산폐수와 같이 C/N비가 낮은 폐수, 질산성질소농도가 높은 산업폐수의 경우 메탄올과 같은 값이 비싼 외부 탄소원 없이 값이 저렴한 황을 이용하여 황산화 탈질미생물에 의해 탈질을 유도하는 장점을 보유하고 있어 독립영양탈질 공정이 국내외에서 이에 대한 연구가 진행되고 있다. 황을 이용한 독립영양탈질 공정은 황산화 탈질균이 여러 종류의 황화합물을 황산염이온으로 산화시키면서 동시에 질산성질소를 질소가스 형태로 전환시키는 원리를 이용한다.

황산화 탈질균은 독립영양 미생물이므로 외부 탄소원이 필요하지 않고, C/N비가 낮은 폐수에 메탄올 대신 값이 싼 황을 투입으로 경제적이며 처리효율이 안정적이고 운전이 쉬운 효과적인 탈질화를 유도할 수 있다. 그러나 초기 적용시 독립영양 탈질균의 우점화 및 보유가 어렵고, 탈질시 알칼리도가 파괴되어 pH가 저하되며, pH가 6.2 이하로 저하시 탈질 효율은 급격히 감소하며, 알칼리도가 낮아지면 탈질이 되지 않거나 고농도의 탈질은 매우 어렵다는 단점이 있다(US EPA, 2009).

이러한 독립영양탈질 공정은 축산폐수뿐 아니라 분뇨, 산업폐수, 침출수, 지하수 등의 낮은 질산성질소 함유 폐수에 적합한 처리공정으로 이용될 수 있다. 그러나 황을 이용한 독립영양 탈질공정은 현재까지 실

험실 수준에서만 연구가 진행되고 있고, 실제 500ppm 이상의 고농도 질산성질소를 함유한 폐수에 적용된 사례는 거의 없다(녹색환경기술, 2005).

### 2.1.2. 종속영양 탈질 공정

종속영양 미생물을 이용한 탈질은 미국 오대호와 체사픽만 등에서 심각한 부영양화가 대두된 1970년대부터 종속영양 탈질을 이용한 질소 및 인 제거 연구가 활발히 시작되었다. 1980년을 기점으로 전 세계적으로 Modified Bardenpho, A/O, A2/O, Phostrip, UCT 등 수많은 질소·인 제거 공정이 등장하였고 이 같은 공정들은 광범위하게 하수처리에 적용되어왔다.

종속영양 탈질은 무산소조의 위치에 따라 전탈질(pre-denitrification)과 후탈질(post-denitrification) 공정으로 나눈다. 전탈질 공정은 폐수내의 유기물을 탄소원으로 사용하여 질소를 제거하는 공정이다. 따라서 외부에서 탄소원을 추가로 공급해줘야 하는 후탈질에 비해 유기물 비용면에서는 경제적이지만 탈질율이 75%이하로 알려져 있어 높은 탈질율을 기대하기는 어렵다. 따라서 낮은 농도로 처리해야 할 경우에는 후단에 후탈질 공정을 두어 다시 탈질해야 한다(US EPA, 2009).

후탈질 공정은 외부탄소원을 인위적으로 주입하여야 하는 공정으로서 부착성장공정이나 부유성장공정으로 운전된다. 유입수의 질산성 질소 농도변화에 매우 민감하며, 외부탄소원 공급을 적절히 조절하지 않으면 효율이 떨어지거나 COD상승으로 인해 뒤에 추가로 유기물제거 공정이 필요할 수도 있다. 본 연구는 COD제거를 위한 추가공정이 없는 후

탈질공정을 최적화하기 위한 것이다.

유기물의 농도가 높은 폐수의 탈질공정으로는 중속영양탈질이 매우 경제적으로 운전될 수 있지만, 우리나라와 같이 유기물 농도가 질소농도에 비해 낮은 경우는 추가적으로 메탄올이나 아세테이트와 같은 가격이 비싼 유기물을 주입하여 탈질반응을 유도시켜야 하므로 대량의 질산성질소함유 폐수처리에는 비용이 매우 커지는 단점이 있기 때문에 적절한 C/N비를 유지하는 것이 중요하다.

질소제거공정은 다양하지만 실제로는 대부분 기본적인 공정의 변형이어서 기본적인 공정만을 Table 2-1에 정리하고 각각을 설명하였다(US EPA, 2010b).

Table 2-1. Relative merits and demerits for processes of denitrification and dephosphorus

설계변수/ 장단점	Process			
	A <sub>2</sub> O	Bardenpho	UCT	VIP
F/M, day <sup>-1</sup> , (BOD)	0.15 - 0.25	0.1 - 0.2	0.1 - 0.2	0.1 - 0.2
HRT, hr				
혐기조	0.5 - 1.5	1 - 2	1 - 2	1 - 2
무산소조(1)	0.5 - 1.0	2 - 4	2 - 4	1 - 2
호기조(1)	3.5 - 6.0	4 - 12	4 - 12	2.5 - 4
무산소조(2)		2 - 4	2 - 4	
호기조(2)		0.5 - 1		
장점	폐슬러지에 인함량이 높음. A/O 대비 질 우수.	슬러지 생성량 최소. 폐슬러지 내에 인함량이 높음. 처리수/총 질소 대비 알카리도와 반응이 최소.	Anoxic조 슬러지 반응, 질산염영향이 제거됨. 5단 Bardenpho보다 저시설비.	Anoxic조 질산염반응이 산소 요구량 및 알카리도 소모량 저감. 호기조 질산염 부하 감소. 인제거 효율영향이 적음.
단점	온도에 민감. A/O 대비 설비와 운전 잡. 운전조건 최적화가 어려움.	내부 순환율이 높아 고비용. A <sub>2</sub> O 대비 반응 조가 크다. 높은 BOD/P필요. 온도영향 불명확. 약품량 불확실.	내부 순환율이 높아 고운전비용. 높은 BOD/P필요. 온도영향 불명확. 약품량 불확실.	내부 순환율이 높아 고비용. 저온시 질소제거능력 저하.

### 2.1.2.1. A<sub>2</sub>O

A<sub>2</sub>O공정은 대표적인 생물학적 질소제거 공정들 중의 하나이다. Fig. 2-1에서 보여주는 A<sub>2</sub>O (Anaerobic, Anoxic, Oxic)공정은 총인 제거용 A/O (Anaerobic, Oxic)공정에 탈질을 위한 무산소조를 추가한 것이다(US EPA, 2010b).

A<sub>2</sub>O공정의 장점은 인과 질소의 제거가 우수하고 인을 제거하기 위한 별도의 무기 응집제 사용이 불필요하다. 그러나 운전조건을 최적화하는 데 어려움이 있고 온도의 영향이 커서 우리나라와 같이 기온의 연교차가 큰 경우는 안정적인 운전이 곤란하다(녹색환경기술, 2005).

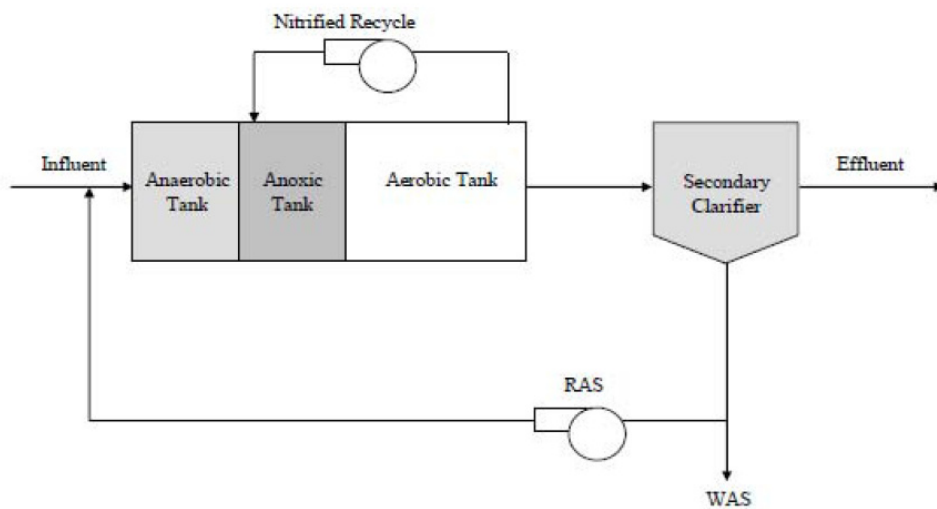


Fig. 2-1. A<sub>2</sub>O process



#### 2.1.2.2. 5단 Bardenpho

5단 Bardenpho 공정은 Fig. 2-2에 보이는 바와 같이 A<sub>2</sub>O공정에 무산소조와 포기조를 하나씩 추가하여 5단으로 변형한 방식이다. 5단 Bardenpho 공정은 슬러지 발생량이 적고 인 함량이 높다는 장점이 있으나 미처리된 질산이온이 침전조에서 혐기조로 반송될 수 있기 때문에 인 방출이 영향을 받을 수 있고 따라서 인의 섭취를 일으킬 수 있는 잠재력을 감소시킨다. 실제로 이 공정은 1mg/L이하의 인을 배출하기는 어려운 것으로 보고되고 있다(US EPA, 2010b).

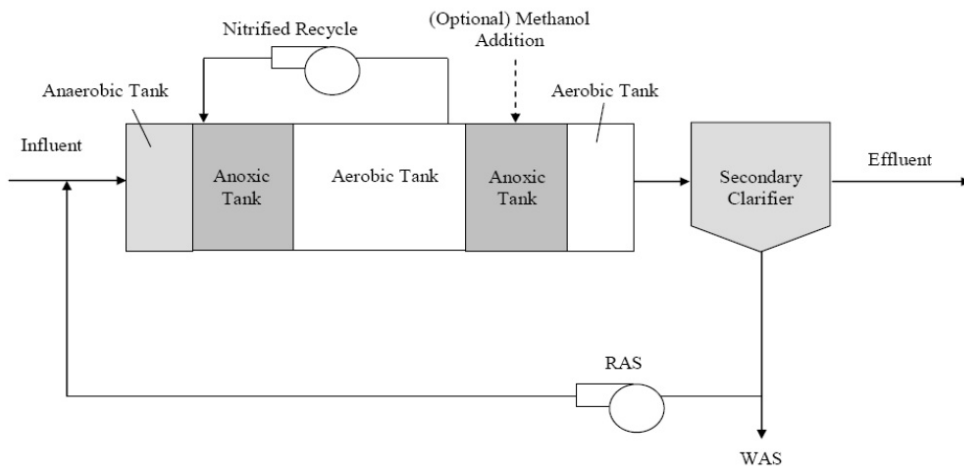


Fig. 2-2. Bardenpho process

#### 2.1.2.3. UCT (University of Cape Town)

UCT공정은 Fig. 2-3에서 보여지는 공정 흐름을 따르며, A<sub>2</sub>O공정과 5단 Bardenpho 공정의 문제점을 개선하기 위해 개발된 것으로 슬러지 반송 지점이 특이하다. 이는 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 이온이 혐기조의 인 방출에 미치는 영향을 최소화하기 위한 것이다.

UCT 공정의 장점은 A<sub>2</sub>O공정보다 효율이 좋지만 내부 순환율의 증가로 운전비가 비싸며 질소의 제거 효율이 떨어지는 것으로 보고되고 있다(US EPA, 2010b).

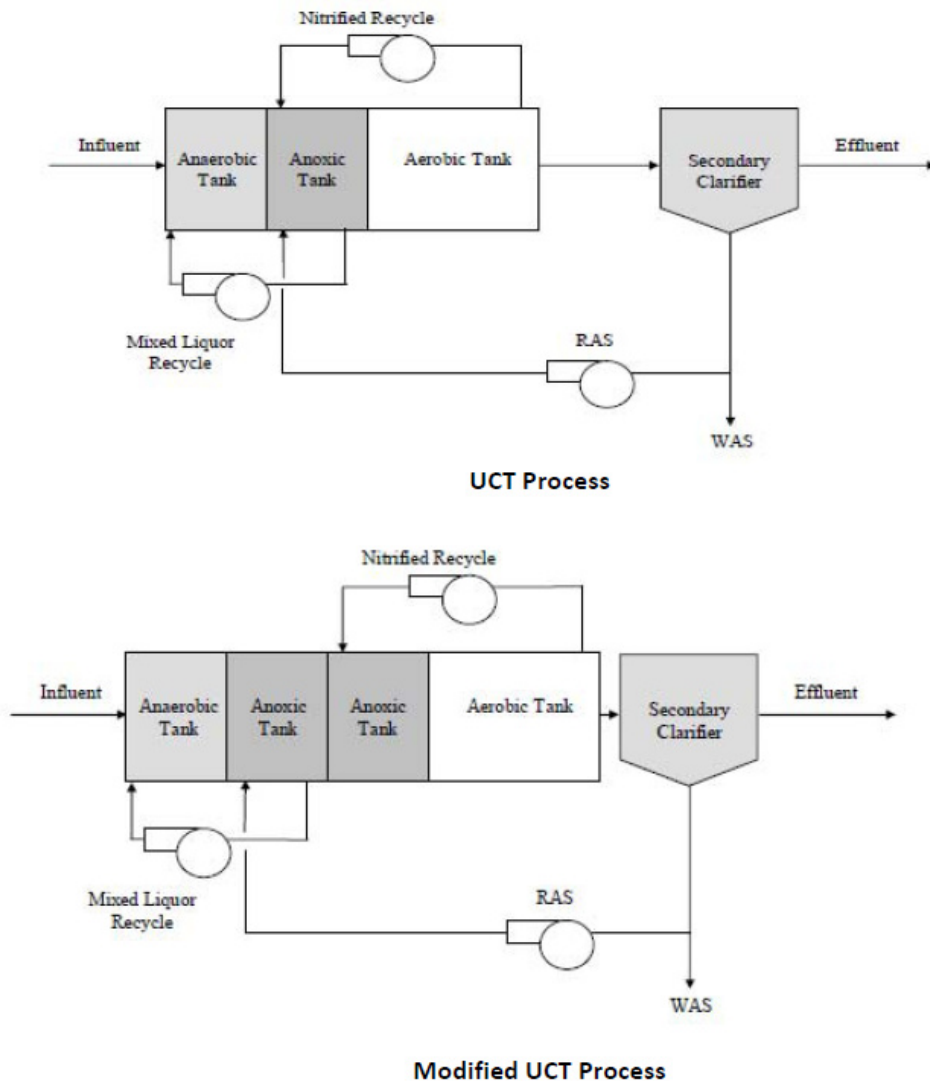


Fig. 2-3. UCT and Modified UCT process

#### 2.1.2.4. VIP (Virginia Initiative Plant)

VIP공정의 기본구조는 UCT와 유사하지만 무산소조와 하나의 포기조가 합쳐진 형식으로 운전상 슬러지의 체류시간을 줄였다.

따라서 이 공정은 미생물의 인 축적량이 늘어나 타 공정에 비해 인 제거 효율이 높고 반응조의 크기가 비교적 작아 부지 면적이 작은 것이 장점이지만 내부순환율이 높아 운전비용이 많이 든다(US EPA, 2010b).

#### 2.1.3. 충전상 생물막 공정

충전상 반응기는 여과 반응기중의 하나로 골재, 슬래그, 세라믹이나 플라스틱류 등의 여재를 충전한 반응기를 말한다. 유체의 흐름과 함께 혐기성 여과반응기와 같이 여재가 채워진 것과 간헐적으로 여재를 투입하는 형식이 있다.

생물학적인 처리의 경우 여재는 생물막을 부착·성장하는 지지대 역할을 하고, 화학적인 흡착의 경우 여재는 흡착반응을 위한 모체역할을 한다. 일반적인 생물막 공정에는 쇄석 등의 여재를 쌓은 여상에 폐수를 살포하는 살수여상 공정과 폐수로 채워진 수조에서 생물막 원판을 회전시키는 회전원판 공정, 특수하게 만들어진 플라스틱이나 입상 활성탄 등 표면적이 큰 여재를 수조에 충전한 침전여상 공정 등이 있다. 이들 공정은 원판이나 여재에 생물막을 증식시켜 폐수 중 유기물질을 생물학적으로 분해한다. 처리하고자 하는 유기물의 종류와 양, 이를 분해하는 미생물의 종류에 따라 산소의 유무, pH, 온도, C/N비 등이 제한인자로 작용한다.

또한 처리하고자하는 유기물질의 종류에 따라 미생물막의 두께

를 일정수준으로 유지하는 것이 중요하다. 호기성 미생물막을 이용하는 경우 생장이 지속되면 일반적으로 알려진 산소 투과깊이 2~3mm를 넘어서는 미생물막 층에는 산소가 투과되지 못해 생물막 내부에 혐기성층이 형성되게 된다.

혐기성층의 미생물 대사에서는 황화수소와 유기산 등이 생성되며 악취가 나게 된다. 또한 호기성층에 증식된 미생물의 일부를 혐기적으로 분해하기도 한다. 이 분해가 진행된다면 생물막은 여재에서 떨어져 새로운 생물막을 형성하기 시작한다. 혐기성층이 현저하게 증대되면 호기적 처리를 방해하는 결과를 가져오므로 생물막의 두께를 알맞게 조절해야 한다.

#### 2.1.3.1. 부유성장

부유성장 방식의 탈질공정에서 미생물은 반응기 내에 부유상태로 유지·교반된다. 반응기의 평균 체류시간(HRT, Hydraulic retention time)은 2~3 시간으로 운전된다.

탈질조 후단에 폭기조가 반드시 필요한데 이는 탈질과정에서 발생하는 질소가스를 탈기하고, 잔류하고 있는 메탄올을 산화시키기 위한 것이다. 질소가스의 방울은 침전지로 유입되기 이전에, 침전지에서 질소가스에 의한 슬러지의 부상을 방지하기 위하여 반드시 제거되어야 한다.

침전된 슬러지의 일정부분은 반응기로 반송되며, 나머지 부분은 적절한 미생물체류시간(SRT, solid retention time)를 유지하기 위하여 폐기된다.

부유성장 방식 탈질 반응기는 탄소원으로 원폐수를 사용하는 경우보다 탈질속도가 빠르기 때문에 반응기가 작고, 과량의 메탄올사용으로 부착성장 방식보다 쉽게 산화된다. 질산화와 탈질이 분리되어 수행되

므로 각 공정의 최적화가 쉽고 고농도의 질소제거가 가능하며 시스템의 조절 및 적용이 간단하다.

반면 분리된 공정의 침전지가 필요하고 질소제거를 위한 단일슬러지 공정과 비교시 단위 공정의 수가 많다.

#### 2.1.3.2. 하향류식 고정상

하향류식 고정상 반응공정(downflow packed-bed systems)은 부착성장 공정의 하나로 물리적으로는 깊이가 깊은 하향류식 사여과지와 같다. 탈질 미생물은 여재에 부착되며, 여재는 성장을 위한 공간으로 제공된다. 메탄올은 여재의 상부에서 주입되며, 질산화된 유입수는 여재를 통과하게 된다.

고정상 반응기는 탈질공정에 적합한데, 그 이유는 생물학적 반응이 발생할 수 있는 충분한 체류시간을 제공하고, 공정에서 공기 중에 노출된 면적이 적어서 탈질에 방해가 되는 산소의 유입을 효과적으로 제한할 수 있기 때문이다.

여재는 굵고, 단단하고, 원형인 고밀도 여재로 구성되어 있다. 이러한 여재는 고형물을 거르고, 탈질 미생물을 저장하는 공간으로 사용된다. 고정상 반응기는 여과나 침전 공정을 생략할 수 있다(US EPA, 2010a).

#### 2.1.3.3. 상향류식 유동상

상향류식 유동상반응기에서 질산화된 2차 처리수는 반응기의 하부로 유입되어 여재를 팽창시킬수 있는 충분한 유량으로 상부로 흐른다. 탈질 미생물들은 모래에 부착되며, 질산화된 유입수가 여재를 통과한다.

일반적으로 소규모 공장에 적용되며 지름 2.4~4.3m, 높이는 다

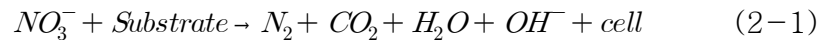
양하게 구성되는 반응기다. 여재층이 팽창하면서 입자가 서로 접촉하지 않기 때문에 여재의 부피 대 표면적의 비율이 매우 높다. 유동상 반응기의 가장 큰 장점은 작은 반응기 크기와 반응기의 수직구조에 따라 높은 미생물 농도에 의한 효율의 증가가 가능하다는 것이다. 생물학적으로 성장가능한 비표면적은 반응기 부피에 따라  $244\sim305\text{ m}^2/\text{m}^3$ 이며 하향류식 고정상 반응기의 비율인  $91\text{ m}^2/\text{m}^3$ 와 비교된다(US EPA, 2010a).

현재까지 유동상 반응기는 한정된 개소에 설치되어 왔으며, 호기성, 무산소, 혐기성으로 적용되었다. 공정은 다양하게 적용되어 왔는데, 주로, 화학처리, 오염된 지하수, 수산물 가공, 도시하수 및 고농도의 산업폐수가 그 예이다. 최근에는 하수처리 보다는 산업폐수처리에 주로 사용되고 있다.

유동상 반응기의 원리는 적용에 관계없이 동일하다. 일정한 원형 여재는 질산화된 유입수가 여재층을 위로 통과할 때 팽창하게 된다. 얇은 활성미생물은 여재의 모든 면에서 형성되며, 이로 인하여 여재가 깨끗한 경우보다 밀도가 감소하게 된다. 밀도가 낮은 입자는 상부로 움직이게 된다. 유동상의 일반적인 특성상 여재층의 막힘 현상이 최소화된다. 매질의 비표면적이 넓고 막힘현상이 없는 경우라면 수리학적 체류시간은 매우 짧아도 된다. 유동상 반응조의 경우 수리학적 체류시간은 10분 이내였다(Rittman et al., 2002).

## 2.2. 탈질 이론 및 제한인자

중속영양탈질반응(heterotrophic denitrification)은 무산소 상태(anaerobic condition)에서 유기 탄소원이 있을 때 중속영양 미생물이 질산성질소를 전자수용체(electron acceptor)로 이용하면서 진행된다. 통상적으로 발효 또는 혐기성반응이라고도 불리는 탈질은 내생호흡조건에서도 일어나지만 그 속도는 매우 느리다.



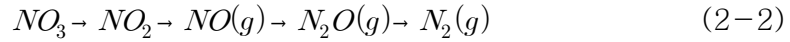
질산성질소는 환원된 후  $N_2$ ,  $N_2O$ ,  $NO$ 와 같은 환원 N형으로 전환되어 최종 처리된다(식 2-1). 탈질반응 중에 탄소원인 유기물의 분해는 호기성과정에서와 마찬가지로다. 열역학 이론에 따르면 무산소 탈질에 비하여 유리탄소의 호기성대사에서 에너지 수량이 큰데, 이는 탈질화 계통에서 무산소상태가 필요함을 나타낸다.

그리고 중속영양 미생물은 1g의 질소에 대하여 COD 3~6 g에 해당하는 탄소를 에너지원으로 요구한다. 이때에 탄소원에 따라 탄소와 질소의 비율은 적절하게 유지되어야 한다. 현재까지는 무산소 조건에서 메탄올이 중속영양미생물에 가장 효율이 좋은 탄소원이라 할 수 있다.

### 2.2.1. 탈질 양론

탈질(Denitrification)을 위한 반응경로에 대한 연구는 다양하게 수행되었는데 일반적으로 알려진 경로는 다음과 같다. 질산 및 아질산을

혐기성 또는 무산소 상태에서 가스상 질소화합물인  $N_2$ ,  $N_2O$ ,  $NO_2$  상태로 전환하여 대기 중으로 방출되는 반응이다(식 2-2).



혐기성 상태와 무산소 상태를 구분하는 이유는 주된 생화학 경로가 혐기성이 아니고 호기성 경로였던 상태를 산소가 없는 상태에서 반응시키기 때문이다. 즉 무산소 조건에서 미생물이 유기물 분해시 산소대신 질산성질소를 전자수용체로 사용하면서 아질산성질소가 질소가스로 변환된다.

미생물 합성을 위해 사용하는 전자공여체는 Fig. 2-4에 나타낸 바와 같이 전자의 일부는 미생물 세포로 전환되고 나머지는 세포로 전환되는 에너지를 공급하기 위해 전자수용체로 전달된다.

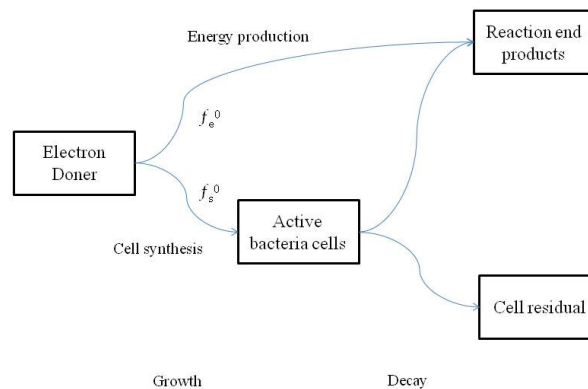


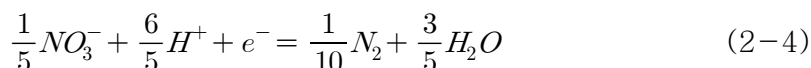
Fig. 2-4. Use of the electron doner for energy production and cell synthesis



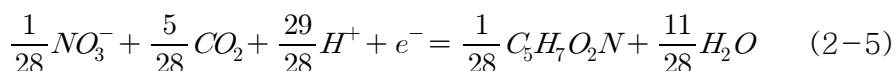
메탄올을 외인성 유기탄소원으로 주입할 때의 반응을 수식으로 표현하면 세포합성시 전자수용체의 반쪽반응식  $R_a$ 와 세포합성 반응식  $R_c$ 는 일정한 비율( $f_e, f_s$ )로 합성하게 되고 공여체의 반쪽반응식  $R_d$ 는 산화하기 때문에 빼주게 되면 전체 반응이 식 2-3이 된다. 실규모 탈질 공정에 관한 연구를 기초로 탈질반응을 위한 메탄올은 탈질 미생물합성에 약 26.7%( $f_s = 0.267$ )가 소요되고  $f_e, f_s$ 의 합은 1이므로 에너지 생성에는 73.3% 즉  $f_e = 0.733$ 이다(McCarty et al., 1969).

$$R = f_e R_a + f_s R_c - R_d \quad (2-3)$$

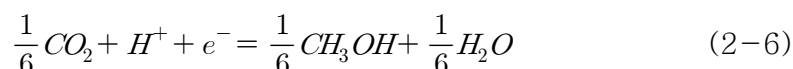
세포합성시 전자수용체 반쪽반응식( $R_a$ )은 2-4이다.



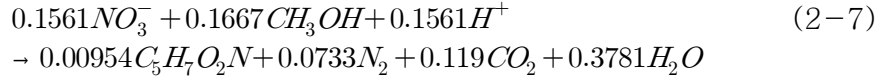
세포합성 반쪽반응식( $R_c$ )은 식 2-5이고



공여체의 반쪽반응식( $R_d$ )은 식 2-6이므로



식 2-4, 5, 6을 각각 식 2-3에 치환하면 식 2-7이다.



식 2-7로부터 질산성질소 2.19g(0.156×14)을 제거하기 위해서는 메탄올 5.334g(0.1667×32)이 필요하고 세포로 1.078g(0.00954×113)을 만들고 질소 2.0524g(0.0733×28)이 가스로 생성됨을 알 수 있다.

식 2-7로부터 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 제거량에 대한 메탄올의 소비량은 식 2-8로 계산된다.

$$\frac{0.1667mol CH_3OH}{0.1561mol NO_3 - N} = 1.0679 \frac{mol CH_3OH}{mol NO_3 - N} \quad (2-8)$$

이를 질량단위로 바꾸면 식 2-9이다.

$$1.0679 \frac{mol CH_3OH}{mol NO_3 - N} \cdot \frac{48g COD}{mol CH_3OH} \cdot \frac{mol NO_3 - N}{14g N} = 3.66 \frac{g COD}{g N} \quad (2-9)$$

따라서 질산성질소 1g/L를 제거하려면 메탄올을 COD환산량으로 3.66g COD/L이 필요하다. 메탄올 1mol은 32g이고 당량분자량은 5.33g/e-eq, 메탄올은 6e-eq/mol 이고 8g OD/e-eq이므로 COD는 48g OD/mol CH<sub>3</sub>OH이다.

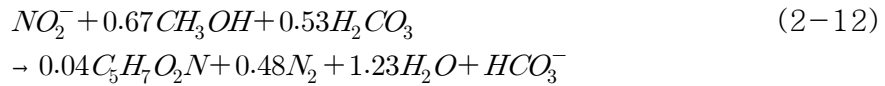
그러므로 1g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/L을 제거하려면 식 2-10에 계산한 바와 같이 이론량으로 메탄올 2.44g이 필요하다.

$$3.66 \frac{g \text{ COD}}{g \text{ NO}_3 - N} \cdot \frac{1g \text{ NO}_3 - N}{L} \cdot \frac{g \text{ CH}_3\text{OH}}{1.5g \text{ COD}} = 2.44 \frac{g \text{ CH}_3\text{OH}}{L} \quad (2-10)$$

같은 방법으로 COD당 생성되는 이론적인 건조미생물량(VS)를 계산하면 식 2-11에서 보는 것처럼 1g COD를 소비하고 미생물 0.1347g이 생성된다. 산소 1당량은 O<sub>2</sub> 8g이므로 전자수용체 1당량은 O<sub>2</sub> 8g의 OD에 해당한다. 따라서 1mg MeOH/L는 1.5mg COD/L과 같다.

$$\begin{aligned} \frac{0.00954 \text{ mol } C_5H_7O_2N}{0.1667 \text{ mol } CH_3OH} \cdot \frac{113g \text{ VSS}}{1 \text{ mol } C_5H_7O_2N} \cdot \frac{\text{mol } CH_3OH}{48g \text{ COD}} \\ = 0.1347 \frac{g \text{ VSS}}{g \text{ COD}} \end{aligned} \quad (2-11)$$

또한 아질산성질소(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N)와 메탄올과의 반응식은 식 2-12이고 산소와 메탄올의 반응은 식 2-16이다.



식 2-12로부터 아질산성질소 14g(1×14)을 제거하기 위해서는 메탄올 21.44g(0.67×32)이 필요하고 세포로 4.52g(0.04×113)을 만들고 질소 13.44g(0.48×28)이 가스로 생성됨을 알 수 있다.

양론식으로부터 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 제거량에 대한 메탄올의 소비량은 식 2-13과 같이 계산할 수 있다.

$$\frac{0.67 \text{ mol } CH_3OH}{1 \text{ mol } NO_2 - N} = 0.67 \frac{\text{mol } CH_3OH}{\text{mol } NO_2 - N} \quad (2-13)$$

이를 질량단위로 바꾸면 식 2-14로 표현된다.

$$0.67 \frac{\text{mol } CH_3OH}{\text{mol } NO_2 - N} \cdot \frac{48 \text{ g } COD}{\text{mol } CH_3OH} \cdot \frac{\text{mol } NO_2 - N}{14 \text{ g } N} = 2.297 \frac{\text{g } COD}{\text{g } N} \quad (2-14)$$

따라서 아질산성질소 1g/L를 제거하려면 메탄올 2.297g COD/L이 필요하다. 메탄올 1mol은 32g이고 당량분자량은 5.33g/e-eq, 메탄올은 6e-eq/mol 이고 8g OD/e-eq이므로 COD는 48g OD/mol CH<sub>3</sub>OH이다.

그러므로 1g NO<sub>2</sub>-N/L을 제거하려면 식 2-15에 계산한 것처럼 이론량으로 메탄올 1.53g이 필요하다.

$$2.297 \frac{\text{g } COD}{\text{g } NO_2 - N} \cdot \frac{1 \text{ mg } NO_3 - N}{L} \cdot \frac{\text{g } CH_3OH}{1.5 \text{ g } COD} = 1.53 \frac{\text{mg } CH_3OH}{L} \quad (2-15)$$

또한 산소와 메탄올의 반응은 식 2-16과 같다. 산소 32g(1×32)을 제거하기 위해서는 메탄올 29.76g(0.93×32)이 필요하다는 것을 알 수 있다.



양론식으로부터 O<sub>2</sub> 제거량에 대한 메탄올의 소비량은 식 2-17

과 같이 계산될 수 있다.

$$\frac{0.93 \text{ mol } CH_3OH}{1 \text{ mol } O_2} = 0.93 \frac{\text{mol } CH_3OH}{\text{mol } NO_2 - N} \quad (2-17)$$

이를 질량단위로 바꾸면 식 2-18와 같다. 따라서 산소 1g/L를 제거하려면 메탄올 1.395g COD/L이 필요하다.

$$0.93 \frac{\text{mol } CH_3OH}{\text{mol } O_2} \cdot \frac{48 \text{ g COD}}{\text{mol } CH_3OH} \cdot \frac{\text{mol } O_2}{32 \text{ g } O_2} = 1.395 \frac{\text{g COD}}{\text{g } O_2} \quad (2-18)$$

메탄올 1mol은 32g이고 당량분자량은 5.33g/e-eq, 메탄올은 6e-eq/mol 이고 8g OD/e-eq이므로 COD는 48g OD/mol CH<sub>3</sub>OH이다. 그러므로 1g O<sub>2</sub>/L을 제거하려면 이론량으로 메탄올 0.93g이 필요하다(식 2-19).

$$1.395 \frac{\text{g COD}}{\text{g } O_2} \cdot \frac{1 \text{ g } O_2}{L} \cdot \frac{\text{g } CH_3OH}{1.5 \text{ g COD}} = 0.93 \frac{\text{g } CH_3OH}{L} \quad (2-19)$$

따라서 식 2-10, 15, 19로부터 필요한 메탄올 이론량을 구하면 식 2-20이다.

$$C_m = 2.44N_0 + 1.53N_1 + 0.93D_0 \quad (2-20)$$

그러나 실험규모 공정으로부터 이론식을 개조한 식 2-21 (McCarty, P.

L. et al., 1969)을 따르고 일반적으로 가장 많이 사용하고 있다.

$$C_m = 2.47 N_0 + 1.53 N_1 + 0.87 D_0 \quad (2-21)$$

여기서,  $C_m$  요구 Methanol 농도(mg/L),  $N_0$  최초  $\text{NO}_3^-$ -N 농도(mg/L),  $N_1$  최초  $\text{NO}_2^-$ -N 농도(mg/L),  $D_0$ 는 최초 용존산소 농도(mg/L)다.

### 2.2.2. C/N비

질산화 과정은 호기성 상태이므로 에너지원으로 산소( $\text{O}_2$ )를 이용하지만 탈질은 무산소 상태의 반응이므로 에너지원으로 탄소(C)를 필요로 한다. 따라서 2차 처리를 거친 처리수 또는 빈부하의 폐수를 탈질하고자 할 때는 유기물질이 부족하므로 유기탄소원을 주입해 주어야 한다.

보충 공급원은 발효 처리한 폐수 또는 슬러지 등 "내부적" 공급원이거나 화학물질 등의 "외부적" 또는 "외인성" 공급원일 수 있다. 일반적으로 사용하는 가장 흔한 외인성 유기탄소원은 메탄올이다. 그러나 안전성, 반응속도, 사용성에 관한 문제 때문에 일부 폐수처리공정은 아세트산, 에탄올, 당, 글리세롤 등을 설비의 요구에 따라 대체 외인성 유기탄소원으로 사용하고 있다(DeBarbadillo et al., 2008). 이중 아세테이트에 의한 탈질효율이 가장 높은 것으로 알려져 있으나, 현재로서는 메탄올이 가장 경제적이어서 주로 사용하고 있다(임점호 등, 2006).

탈질시 C/N비는 최소한의 범위를 넘어야 가능하다. 중속영양탈질미생물은 탈질에 필요한 에너지원으로 유기물을 사용하기 때문이다.

C/N비에 대해서는 여러 연구가 수행되어 왔는데 이를 종합해 보면 4.0 이상의 C/N비를 유지할 필요가 있다.

C/N비에 대한 연구는 탈질효율과의 관계를 밝히는 연구 외에도 C/N비가 감소하면 질소제거율이 감소하는 반면, 문제가 되고 있는 온난 화물질인  $N_2O$ 로의 전환율은 증가한다(김동진 등, 2011)는 연구결과도 있다.

식 2-21에서 1g  $NO_3^-$ -N당 2.47g 메탄올로 제시한 바, 이를 COD로 환산하면 1.5배인 3.71g COD다. 따라서 2차처리의 질산화가 완전하게 진행되어  $NO_2^-$ -N,  $O_2$ 가 전혀 없다면 이론적인 최소 C/N비는 3.71이다. Karen(2009)이 MBBRs공정을 대상으로 정리한 Table 2-2를 보면 미국하수처리장에서는 완전한 탈질을 위해 C/N비를 4.4~5.0(g COD/g  $NO_3^-$ -N)으로 메탄올을 투입하고 있는 것으로 조사되었다. 또한 메탄올을 기준으로 하지 않고 폐수를 외인성 유기탄소원으로 사용하는 경우, 제거해야 할  $NO_3^-$ -N g당 4g의 유입 BOD가 필요하다(Tchobanoglous, 2003). C/N비가 이론량 3.71보다 큰 이유는 하수처리장의 공정효율문제와  $NO_2^-$ -N,  $O_2$  등의 간섭에 원인이 있다.

Table 2-2. Comparison of alternative carbon sources in post-denitrifying MBBRs

	Temp	Media fill	Carbon Source	C/N	units	Specific Denit. Rate	units	Reference
Nordre Follo WWTP pilot study	7-10°C	40-50%	Sodium Acetate	4.0	g COD <sub>added</sub> / g $NO_3^-$ -N <sub>eq</sub>	2.2	g $NO_3^-$ -N/m <sup>3</sup> /day	Rusten et al. 1995
Jessheim WWTP batch study	10°C	50%	Methanol	4.6	g COD <sub>used</sub> / g $NO_3^-$ -N <sub>eq</sub> removed	1.4	g $NO_3^-$ -N/m <sup>3</sup> /day	Rusten et al. 1996
			Ethanol	4.3	g COD <sub>used</sub> / g $NO_3^-$ -N <sub>eq</sub> removed	3.0	g $NO_3^-$ -N/m <sup>3</sup> /day	
			Spent Monopropylene glycol (MPG)	5.6	g COD <sub>used</sub> / g $NO_3^-$ -N <sub>eq</sub> removed	1.3	g $NO_3^-$ -N/m <sup>3</sup> /day	
Sjolunda WWTP pilot study	16°C	50%	Methanol	4-5	g COD/ g $NO_3^-$ -N <sub>eq</sub>	2.0	g N/m <sup>3</sup> /day	Aspegren et al. 1998
			Ethanol	4-5	g COD/ g $NO_3^-$ -N <sub>eq</sub>	2.5	g N/m <sup>3</sup> /day	
Sjolunda WWTP	10-20°C	50%	Methanol	4.4	g COD <sub>added</sub> / g $NO_3^-$ -N <sub>removed</sub>	1.1	g $NO_3^-$ -N/m <sup>3</sup> /day	Tailjemark et al. 2004
Klagshamn WWTP	10-20°C	36%	Waste Ethanol	5.4	g COD <sub>added</sub> / g $NO_3^-$ -N <sub>removed</sub>	1.1	g $NO_3^-$ -N/m <sup>3</sup> /day	Tailjemark et al. 2004
Lillehammer WWTP	11-2°C	40-50%	Ethanol	3.4	g COD/ g $NO_3^-$ -N <sub>eq</sub>	3.5	g $NO_3^-$ -N/m <sup>3</sup> /day	Odegaard 2006
Gardemoen WWTP	13-14°C	40-50%	Ethanol	3.8	g COD <sub>added</sub> / g $NO_3^-$ -N	~0.8	g $NO_3^-$ -N/m <sup>3</sup> /day	Rusten & Odegaard 2007
Noman Cole PCP	18.5-20°C	30%	Methanol	5.0	g COD <sub>added</sub> / g $NO_3^-$ -N	2.5-3.0	g $NO_3^-$ -N/m <sup>3</sup> /day	Motsch et al. 2007

Note:  $NO_3^-$ -N<sub>eq</sub> includes  $NO_3^-$ -N equivalents of DO and  $NO_2^-$ -N

### 2.2.3. 온도

미생물을 이용하는 모든 탈질공정은 온도의 영향을 받는다. 온도의 영향에 대한 일반적으로 쓰이는 Arrhenius식은 식 2-22와 같다.

$$r_{D(t)} = r_{D(20)} \times \theta^{T-20} \quad (2-22)$$

여기서  $r_{D(t)}$ 는 탈질효율(g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/g VS · d),  $r_{D(20)}$ 는 20℃에서 탈질효율,  $\theta$ 는 경험적 온도상수, T는 온도(℃)다. 경험적 온도상수  $\theta$ 에 대해 연구결과 값을 Table 2-3에 정리하였다.

식 2-22에 의하면 탈질효율은 5~25℃에서 주로 진행되며 5℃ 이하에서는 급격히 감소하고 온도가 10℃ 상승할 때 대략 2배 정도 증가하게 된다.

Table 2-3. Values for Arrhenius temperature coefficients

Condition	$\theta$	Reference
Anaerobic/Microcosms	1.24	Veraart, A.J., et al., 2011b
Anaerobic	1.28	Nichols, A., et al., 2007
Anaerobic	1.09 – 1.13	Dold, P., et al., 2008
Anaerobic	1.14	Cherchi, C., et al., 2008



식 2-23은 5~30℃의 범위에서 유효하고 3℃에서는 중지되는 조건에서 탈질효율과 온도의 관계를 표현한 식이다(Dawson et al., 1973).

$$r_{D(\max,t)} = 0.07 \cdot 1.06^{(T-20)} \quad (2-23)$$

여기서  $r_{D(t)}$ 는 탈질효율(g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/g MLSS-hr), T는 온도(℃)다.

또한 Strohmeier는 미생물부유공정 실험을 통해 경험적으로 탈질과 온도의 관계를 식 2-24로 나타냈다(Strohmeier et al., 1993).

$$r_{D(\max,t)} = r_{D(\max,15)} e^{K_T(T-15)} \quad (2-24)$$

$r_{D(\max,t)}$ 는 어떤 온도( $t$ )에서 최대 탈질효율(g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/m<sup>3</sup>-d)이고  $r_{D(\max,15)}$ 는 15℃에서 최대 탈질효율(g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/m<sup>3</sup>-d)이며  $K_T$ 는 경험적 온도상수(0.07/℃), T는 온도(℃)다.

DO농도가 같고 수온이 10℃ 차이가 나면 탈질효율은 약 1 kg/m<sup>3</sup>-d 정도의 차이가 난다(Farabegoli et al., 2007). 일반적으로 탈질 반응은 온도가 낮아질수록 효율이 감소하는 반면, 40℃까지는 온도가 증가할수록 탈질 효율도 증가한다고 알려져 있으며, Fig. 2-5에서 볼 수 있듯이, 메탄올을 전자 수용체로 사용하는 탈질 미생물의 경우 수온이 15℃일 때, 20℃에 비하여 70%의 효율을 나타내는 반면, 10℃ 이하로 수온이 떨어지면 효율이 50%로 하락하는 것을 확인할 수 있다(IWA Publishing, 2006).

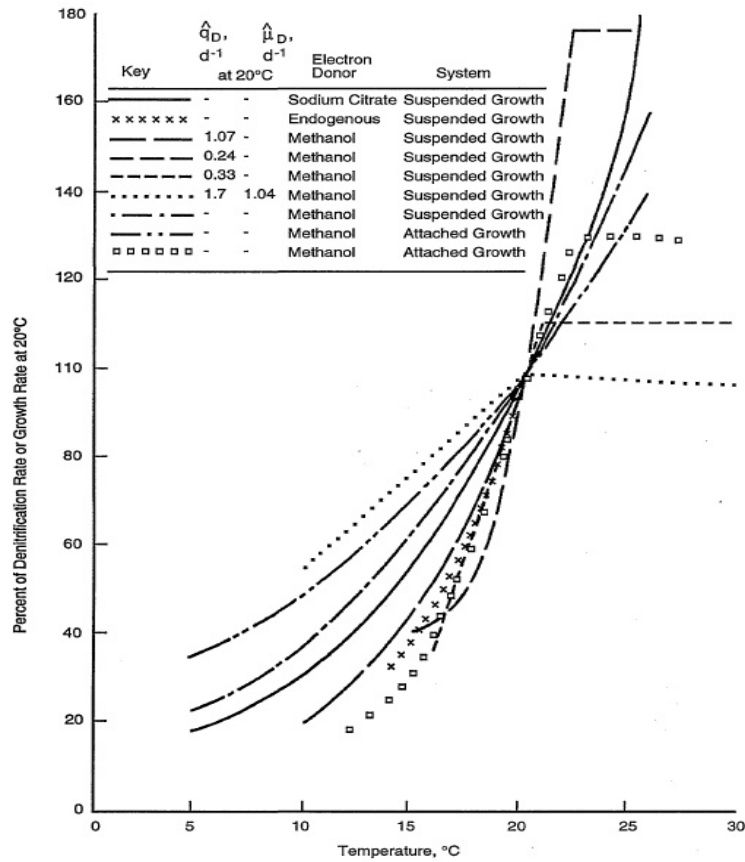


Fig. 2-5. Correlation between denitrification rate and temperature

#### 2.2.4. 용존산소

탈질에서 용존산소는 결정적인 영향을 미친다. 만약 혐기조에 미량의 용존산소가 존재하게 되면 탈질미생물중 약 80%를 차지하는 임의성 종속영양미생물은 NO<sub>x</sub>와 결합된 산소보다는 수중에 용존된 분자성 산소를 더 선호하기 때문에 탈질을 저해하는 원인이 된다. 탈질미생물은

질산성질소와 산소가 공존하는 경우 최종 전자수용체로 산소를 더 선호한다(IWA, 2006).

탈질속도는 일반적으로 다음 식으로 나타낼 수 있다(김인수, 2001).

$$R_{DN} = K_{DN} \cdot X_v \cdot 1.09^{(T-20)} \cdot (1 - DO) \quad (2-25)$$

여기서  $R_{DN}$ 은 총괄탈질속도이고  $K_{DN}$ 은 탈질속도 상수이고  $X_v$ 는 탈질미생물농도이며  $T$ 는 온도( $^{\circ}\text{C}$ ),  $DO$ 는 용존산소농도다.

혐기성 환경에서의 탈질속도는 미생물 플럭의 무산소 분율과 탄소원의 가용성에 따라 달라진다. 식 2-25에서  $DO$ 항은 용존산소농도가 1.0 mg/L에 접근하면 탈질속도가 0에 접근하는 것으로 해석된다.

미생물학적 접근에 의한 탈질해석을 보면 일반적인 탈질균으로 알려진 *Pseudomonas*는 반응기내부의 용존산소 농도가 0.2mg/L 이상에서는 방해받을 받는다(Dawson, R. N. et al., 1972)고 하기도 하고, *Azospirillum Brasilense*의 탈질효율을 위해 0.5mg/L 이하로 유지할 필요가 있다(박준범, 2004)는 연구결과도 있으며, 일반적인 서적에는 0.5 mg/L 이하 또는 1mg/L 이하로 정의하고 있다.

반면 0.13mg/L 이하가 되면 탈질반응이 중지되었다는 연구결과(Nelson L. M., 1978)와 0.09mg/L 이하가 되면 탈질미생물의 활성을 저해한다는 연구결과(Oh, J. et al., 1999)도 있다. 또한 용존산소의 농도가 0.2mg/L일 때는 용존산소의 농도가 0mg/L일 때에 비해 약 50%정도라는 연구결과(Wheatland, A.B., 1959)도 있었다(Table 2-4).

Table 2-4. Permissible DO concentrations for denitrification

DO and species	Reference
DO<1.0mg/L, Conventional denitrifiers	김인수, 2001
DO<0.5mg/L, <i>Azospirillum Brasilense</i>	박준범, 2004
DO<0.2mg/L, <i>Pseudomonas</i>	Dawson, R. N. et. al., 1972
0.13mg/L<DO, Conventional denitrifiers	Nelson L. M., 1978
0.09mg/L<DO, Conventional denitrifiers	Oh, J. et. al., 1999

연구결과를 요약하면 탈질 용존산소의 농도범위가 0.09~1.0mg/L의 범위 내에 있으나 일치된 정보는 없다. 이는 탈질 미생물이 전자수용체로 산소와 유기탄소원 둘 다를 사용할 수 있는 임의성에서 기인하며, 세세하게는 미생물 종별로도 다른 용존산소 대역에서 활성을 띄는 것으로 보인다. 각각의 미생물이 선호하는 용존산소대역이 미세하게 다르다는 것을 알 수 있다.

## 2.3. 탈질 미생물과 우점도

### 2.3.1. 주요 탈질 미생물

탈질은 질소순환과정의 한 부분이다. 단백질과 핵산의 성분인 질소는 지구에 존재하는 생물에게 필수원소이다. 대기의 79%가 질소기체이며 유기체에 유용하지 않은 형태로 존재하지만 미생물에 의한 일련의 변환을 통해 식물에 유용한 형태로 변하고, 궁극적으로 식물은 모든 동물의 생명을 유지시키는 먹이로 사용된다. 순차적으로 일어나지는 않지만 단계를 분류하면 질소고정, 질소동화, 암모니아화 반응, 질산화 반응, 탈질산화 반응 순으로 일어난다(Fig. 2-6).

질소순환에서와 마찬가지로 하수처리장에서 질소를 처리하는 과정도 질산화과정과 탈질과정으로 구분한다. 질소순환과정에 관여하는 미생물을 Table 2-5에 제시하였다.

다양한 임의성 종속영양 미생물은 탄소원이 있으면 탈질이 가능하다. 임의성이란 미생물이 분자상태의 산소유무와 관계없이 활동하는 것(<http://www.ceric.net>)으로서, 탈질에서는 필요로 하는 산소를 질산성질소로부터 얻을 수도 있고 용존산소로부터도 얻을 수 있는 미생물의 특성을 말한다. 무산소 조건에서 질산기나 아질산기를 전자수용체로 사용하는 임의성 종속영양 미생물 등이 여기에 속한다.

이러한 탈질균의 임의성 때문에 질소산화물과 탈질균이 있다 하더라도 필연적으로 탈질이 일어난다고 단정할 수는 없다. 따라서 반응기 내 산소농도는 탈질에 중요한 운전요소(control factor)가 된다.

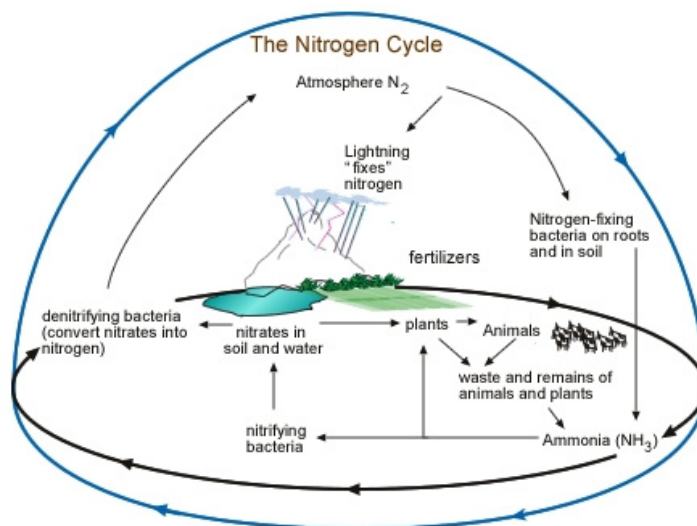


Fig. 2–6. Nitrogen cycle  
<http://telstar.ote.cmu.edu/enviro/m3/s4/cycleNitro.shtml>

Table 2–5. Organisms performing various activities in nitrogen cycle

Nitrification		Proteolysis	Volatilization	
Nitrosification	Nitrification	Ammonification	Anammox	Denitrification
$NH_3 \rightarrow NO_2$	$NO_2 \rightarrow NO_3$	Amino acids $\rightarrow$ ammonia	$NH_3 + NO_2 \rightarrow N_2 + H_2O$	$NO_2, NO_3 \rightarrow N_2$
<i>Nitrosomonas</i>	<i>Nitrospina</i>	<i>Heterotrophs – A</i>	<i>Planctomycetes</i>	<i>Alcaligenes</i>
<i>Nitrosobibrio</i>	<i>Nitrococcus</i>	<i>sp. pergillus flvus</i>	<i>: planctomyces</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Nitrosococcus</i>	<i>rubrum</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Pirellula</i>	<i>Branhamell</i>
<i>Nitrosospira</i>	<i>Nitrobater</i>	<i>sp.</i>	<i>Freshwater – Bro</i>	<i>Corynebacterium</i>
<i>Nitrosolobus</i>	<i>Nitrospira</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>cadia</i>	<i>Flavobacterium</i>
		<i>Bacillus sp.</i>	<i>Marine – Scalindu</i>	<i>Hypomicrobium</i>
		<i>Vivrio sp.</i>	<i>a</i>	<i>Propionibacteria,</i>
				<i>Pseudomonas,</i>
				<i>Rhizobium,</i>
				<i>Rhodopseudmonas</i>
		$NO_2^- \rightarrow NH_4^+$		
		<i>Clostridium sp.</i>		

중속영양 탈질세균은 폐수 처리에 매우 흔하며 *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Hyphomicrobium*, *Moraxella*, *Nesseria*, *Paracoccus*, *Propionibacteria*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Spirillum* 및 *Vibrio* 같은 속(genus)을 포함한다(Tchobanoglous et al., 2003).

16S rRNA gene sequencing, FISH(Fluorescence *in situ* hybridization) 등의 유전자 분석방법을 통하여 분석한 바에 의하면, 메탄올을 전자공여체로 주입하는 경우 *Methylophilales*, *Methyloversatilis*, *Hyphomicrobium*, *Paracoccus* 균이 우점하는 탈질균이고, 아세테이트를 전자공여체로 주입하는 경우는 *Betaproteobacteria*의 *Comamonadaceae*와 *Rhodocyclaceae*가 우점종이다(Timmermans et al., 1983; Van Verseveld et al., 1978; Baytshtok et al., 2008; Baytshtok et al., 2009; Ginige et al., 2004).

최근에는 은 동위원소 추적법을 사용하여 분석한 결과 *Hyphomicrobium zavarzinii* 외에 *Methyloversatilis universalis* 균주를 규명하기도 하였다(Baytshtok, V., 2008). 이러한 결과들로부터 환경 조건에 따라 미생물 군집조성이 달라져 탈질효율에 영향을 주게 됨을 알 수 있다.

또한 탈질화 유동층 반응기 내에서 전자수용체로서 아질산염을 사용하여 암모니아를 질소가스로 산화시키는 능력이 있는 독립영양 박테리아를 발견하였다(Mulder, A., 1995). Table 2-5에 정리한 이런 생물학적 반응을 ANAMMOX(혐기성 암모니아 산화)라고 하며 국내에서도 많은 연구가 진행되고 있다.

탄소를 주입하지 않고 아질산염을 환원시킬 수 있는 *Candidatus Brocadia anammoxidans* 및 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 등의 독립영양미생물이 ANAMMOX 공정에서 발견되는데 이들은 박테리아 도메인의 한 문(Phylum)인 *Planctomycetales* 목(Order)에 속한다. 혐기성 조건에서 아질산염을 환원시켜 암모니아를 산화시킴으로써 질소 가스를 생성한다(Schmidt et al., 2003).

이에 속하는 미생물들은 성장이 느리고, 25° C 이상의 온도에서 반응이 활발해 온도를 일정하게 맞추고 용존산소에 민감해 이를 정확하게 맞춰야 하는 문제점이 있다.

끝으로 탈질미생물은 중속영양미생물뿐만 아니라 독립영양미생물도 존재한다. 독립영양미생물 박테리아들 중 *Paracoccus ferrooxidans*, *Paracoccus denitrificans*, *P. pantotrophus*, 및 *P. versutus* 등은 질산염이나 아질산염을 전자수용체로 사용하여 영가철과 이가철(Fe(II))을 산화시키면서 탈질하는 반응과 *Nitrosomonas eutropha*, *nitrosomonas europaea* 및 *nitrosolobus multififormis*에 의해 황화합물이 환원되면서 탈질하는 반응이 관찰되었다(Kumaraswamy et al., 2006). 무산소 조건에서 *Nitrosomonas*에 의한 암모니아 산화는 느려서(Schmidt et al., 2003) 실용성은 없다(Littleton et al., 2003).



## 2.3.2. 우점도 분석 이론

### 2.3.2.1. 16S rRNA 개념

Carl Woese에 의해 창시된 16S rRNA 유전자 분석은 미생물의 정확한 계통분류를 가능케 하였다. 16S rRNA는 16S 리보솜 RNA라고 불리며 박테리아와 고세균같은 원핵생물 리보솜의 30S 소단위체를 구성하고 있는 rRNA로 1,500 뉴클레오타이드(bp) 정도의 길이를 가지고 있다.

16S rRNA의 서열은 상당히 잘 보존되어 있는 한편 일부 구간에는 염기서열의 다양성이 높아서 미생물간의 인식을 가능하게 한다. 이것은 사람의 지문을 이용하여 개체를 분류·인식 가능한 것과 같은 원리이다.

16S rRNA 유전자가 원핵생물의 계통분류에 효율적인 이유는 동일한 종간에 97%이상의 높은 유사성을 가지고 있고 타종 간에는 97%이하의 낮은 유사성을 가지기 때문이다. 디지털 정보로 구성된 뉴클레오타이드(bp) 서열은 다양한 통계분석을 가능하게 한다. 동종 간에는 동일한 생화학적 특징을 가지는 것이 보통이므로 환경 생물공정 해석에 유용한 분석방법이다.

16S rRNA 유전자에 기반한 분자생물학적 분석방법은 크게 정성분석과 정량분석으로 나눌 수 있는데 가장 완벽한 형태의 정성분석은 클로닝(cloning)과 염기서열분석(sequencing)으로 1,500bp 길이의 유전자를 읽어내어 데이터베이스와 상호 비교를 통해 미생물의 종 정보를 얻는다.

미생물의 세포내에서는 다량의 rRNA가 존재하는데 그 중 16S 및 18S rRNA는 각 미생물 종마다 염기서열이 다르지만 매우 비슷한

구조를 공유하고 있어 이것을 이용하여 미생물 종을 구분할 수 있다. 따라서 설계되는 프루브(probe)에 따라 검출되는 미생물을 결정할 수 있으며 프루브는 적절한 조건하에 목적하는 DNA 또는 RNA에 결합(bind)되지만, 상보적인 서열이 존재하지 않거나 조건이 맞지 않으면 교접(hybridization)은 일어나지 않고 프루브는 세포에서 씻겨진다(Jennifer et al., 2001; Schramm, 2003).

#### 2.3.2.2. 생활성도 관찰

탈질 박테리아에서 아질산성질소를 일산화질소로 환원하는 효소(nitrite reductase)는 대표적으로 두 가지를 들 수 있는데, 하나는 nirS 유전자에 의해 전사된 cytochrome cd1 type nitrite reductase이며, 다른 하나는 nirK 유전자에 의해 전사되고 구리(Cu)를 포함하는 nitrite reductase이다(Glockn et al., 1993). 탈질과 관련된 기능성 유전자로 nirK와 nirS는 많은 연구가 있었다.

유전자의 구성이 다양하기 때문에 다수의 탐침자를 사용하여 정성분석을 시행한다. 탐침자 프라이머는 특정 DNA와 반응하여 발색하는 물질이다. Braker 등이 제시한 탐침자를 Table 2-6에 정리하였다(Braker et al., 1998).

Table 2-6. Primers for live/dead cell staining

Primer	Position	Primer Sequence
nirK1F	526-542	GG(A/C)ATGGT(G/T)CC(C/G)TGGCA
nirK2F	565-581	GC(C/G)(C/A)T(C/G)ATGGT(C/G)CTGCC
nirK3R	898-918	GAACCTTGCCGGT(A/C/G)G(C/T)CCAGAC
nirK4R	942-959	GG(A/G)AT(A/G)A(A/G)CCAGGTTTCC
nirK5R	1023-1040	GCCTCGATCAG(A/G)TT(A/G)TGG
nirS1F	763-780	CCTA(C/T)TGGCCGCC(A/G)CA(A/G)T
nirS2F	855-874	TACCACCC(C/G)GA(A/G)CCGCGCGT
nirS3F	1002-1019	TTCCT(C/G/T)CA(C/T)GACGGCGGC
nirS4F	1317-1336	TTC(A/G)TCAAGAC(C/G)CA(C/T)CCGAA
nirS3R	1002-1019	GCCGCCGTC(A/G)TG(A/C/G)AGGAA
nirS5R	1494-1514	CTTGTTG(A/T)ACTCG(C/G)(C/G)CTGCAC
nirS6R	1638-1653	CGTTGAACTT(A/G)CCGGT

### 2.3.2.3. 중합효소연쇄반응을 이용한 DNA 증폭

중합효소연쇄반응(PCR, polymers chain reaction)은 특정 DNA 부위를 반복 · 합성하여 원하는 DNA 분자를 증폭시키는 방법으로, 아주 적은 양의 DNA를 이용하여 많은 양의 DNA 합성이 가능하다.

DNA시료로부터 원하는 구간의 유전자를 중합효소연쇄반응을 통해 증폭한다. 중합효소연쇄반응은 DNA 또는 RNA의 특정영역을 시험관에서 대량으로 증폭하는 기술로 T-RFLP 분석과 클로닝(clonning)의 첫 번째 과정이다.

중합효소연쇄반응은 크게 3단계로 이루어지는데, 이중가닥(double strand)으로 되어 있는 주형(template)을 준비한 후, 먼저 95℃에서 두 가닥의 DNA를 단일가닥의 DNA로 분리하는 변성(denaturation)을 실시한 다음, 변성된 단일 가닥 DNA(single

stranded DNA)에 프라이머(primer)를 50~65℃에서 결합시키는 아닐링(annealing)을 실시한다. 이때 프라이머는 증폭하고자 하는 DNA와 접하는 부위의 서열과 상호보완적인 올리고 뉴클레오타이드 프라이머(oligo nucleotided primer)를 사용한다. 마지막으로 72~75℃에서 폴리머레이즈(polymerase)가 프라이머로부터 DNA를 합성하는 신장과정(extension 또는 elongation)이 필요하다. 이때 사용되는 폴리머레이즈는 고온에서 번식하는 Taq(thermus aquaticus)와 같은 세균의 DNA 폴리머레이즈를 이용한다. 3단계를 반복적으로 기계를 이용하여 시행함으로써 증폭된다. 이러한 증합과정을 Fig. 2-7에 나타냈다.

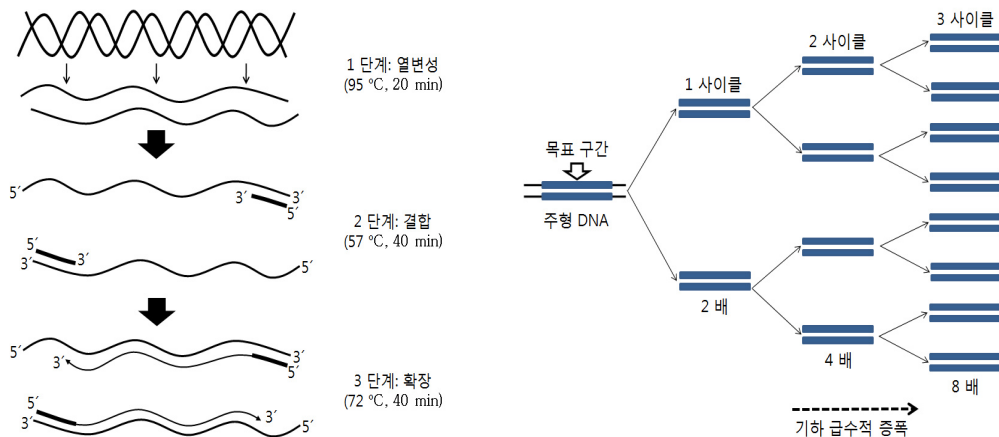


Fig. 2-7. The principle of PCR

이러한 증합효소연쇄반응은 암과 관련된 바이러스(virus)나 패췌췌(pathogen)의 검출, 인간게놈프로젝트(human genome project)에서 염기서열분석이나 유전자지도를 만드는 인간유전자학(human genetics), 멸종된 과거생물의 유전적 구성을 분석하는 진화생물학(evolutionary biology), 친자 감별이나 법의학적 용도인 유전자 핑거프

린팅(genetic fingerprinting) 등에 응용하고 있으나 환경분야에서는 아직 RTQ-PCR을 이용한 탈질 기능성 유전자에 대한 정량분석은 구축된 바가 없고  $^{13}\text{C}$ -DNA를 이용한 고도화된 Stable-Isotope Probing에 대한 연구결과가 있었다(Osaka, 2006).

#### 2.3.2.4. T-RFLP

가장 비용 효율적인 미생물 정성분석은 T-RFLP(terminal restriction fragment length polymorphism)분석이다. 이 방법은 중합효소연쇄반응으로 증폭된 DNA가 제한효소(restriction enzyme)에 의해 절단된 끝단면의 크기를 레이저스캐닝으로 분석하여 미생물의 다양성을 확인하는 방법이다.

T-RFLP는 프라이머에 형광물질을 결합하여 중합효소연쇄반응으로 목표 유전자를 증폭한 후, 제한효소에 의해 절단되어 생성되는 말단 절편 유전자의 다양성을 분석하는 방법이다. 형광물질로 HEX, TET, FAM 등이 사용되며 일반적으로 전방향 프라이머에 결합되나, 미생물군집 분석의 정밀도를 높이기 위해 역방향 프라이머와 동시에 결합하기도 한다. 분석을 통해 도출된 말단 절편의 길이정보는 T-RFLP용 데이터베이스와 비교되고, 환경 시료에 자생하는 미생물을 판별한다(Fig. 2-8).

T-RFLP의 데이터에 영향을 주는 인자는 프라이머의 종류, 제한효소의 종류이다. 사용되는 제한효소는 여러 가지가 있을 수 있으나, *TaqI*, *HaeIII*, *AluI* 등 4 단위의 염기서열을 인식하여 절단하는 제한효소가 자주 사용된다.

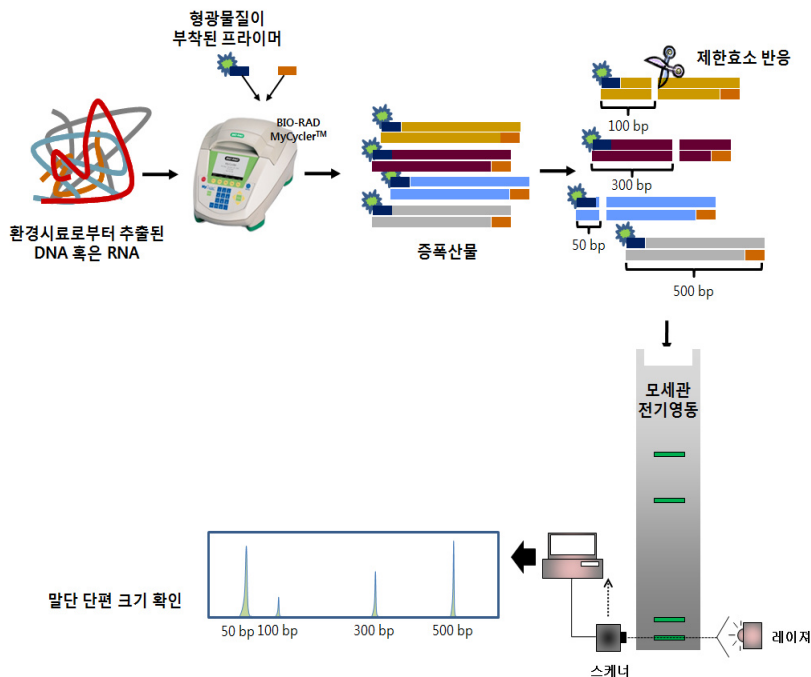


Fig. 2-8. The process of T-RFLP analysis

### 2.3.2.5. 클로닝과 염기서열분석

Fig. 2-9에 클로닝 과정을 그림으로 나타내었다. 먼저 중합효소 연쇄반응을 통해 증폭된 유전자 시료는 다양한 유전자들이 섞인 혼합체이기 때문에 섞인 유전자들을 각각 하나로 분리해야 한다. 이를 DNA 절단이라 하며 절단하는 효소는 디엔에이즈(DNAase)와 제한효소가 있다. 디엔에이즈는 DNA를 무작위로 자르는 효소이고 제한효소는 특정한 염기서열을 인식해서 그 부위만을 잘라낸다.

제한효소에 의해 절단된 DNA 말단은 리게이션(ligation)이라는 과정을 거쳐 연결하는 기술로 클로닝의 두 번째 과정이다. 이 때 사용하는 효소가 리가아제다. 중합효소연쇄반응을 통해 증폭된 시료를 클로닝 벡터(cloning vector)에 삽입하여 합성시킨다. 클로닝벡터는 중합효소연

쇄반응을 통한 증폭산물을 숙주세포인 대장균(*Escherichia coli*) 내부로 운반하는 운반체 역할을 한다. 대장균은 플라스미드 DNA(plasmid DNA)라는 벡터를 가지고 있어서 DNA 클로닝 과정에 주로 이용된다.

리게이션한 DNA를 형질전환을 통해 숙주세포인 대장균 안으로 삽입(insertion)한다. 외래 DNA를 숙주세포가 받아들여 하여 유전자를 변형하는 것이 형질전환이다

형질전환을 통해 대장균안에 들어간 재조합 DNA가 제대로 들어갔는지를 확인하는 것을 선택배지라 한다. 클로닝벡터에는 항생제에 대한 내성 유전자와 베타갈락시다제(*Beta-galactosidase*) 유전자와 접착말단을 가진 외래 유전자가 삽입되어 있다.

베타갈락시다제 발색시약 X-Gal과 외래유전자발현 촉진물질 IPTG를 이용하여 정상적으로 발색한 클로니를 골라내어 항생제 엠포실린이 있는 배지에 배양해서 증폭산물이 정상적으로 포함된 클로닝벡터를 선별·분리한다.

이상의 클로닝과정을 통해 증폭된 16S rRNA 유전자 및 기능성 유전자의 염기서열을 분석하는 것을 염기서열분석이라고 한다. Fig. 2-10에 보인 이 기술은 Sanger에 의해 개발되어 Sanger 방법이라고도 불리며 효소를 이용한 DNA 합성법인 중합효소연쇄반응부터 시작한다.

증폭 시, 디옥시뉴클레오티드(Deoxynucleotide, dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 줄여서 dNTPs)와 디디옥시뉴클레오티드를 동시에 DNA 합성의 재료로 사용하여, 디옥시뉴클레오티드가 사용되면 반응이 계속 진행되고, 디디옥시뉴클레오티드를 만나면 연쇄반응이 종료된다.

이 증폭 산물들을 전기 영동하여 크기가 작은 산물부터 크기가 큰 산물까지 배열한다. 네 가지 디디옥시뉴클레오티드에는 각각 다른 파

장에서 반응하는 형광물질이 부착되어 있다. 각 위치에 있는 형광물질의 반응을 측정하게 되면 이것이 곧 목표 DNA의 염기서열이다.

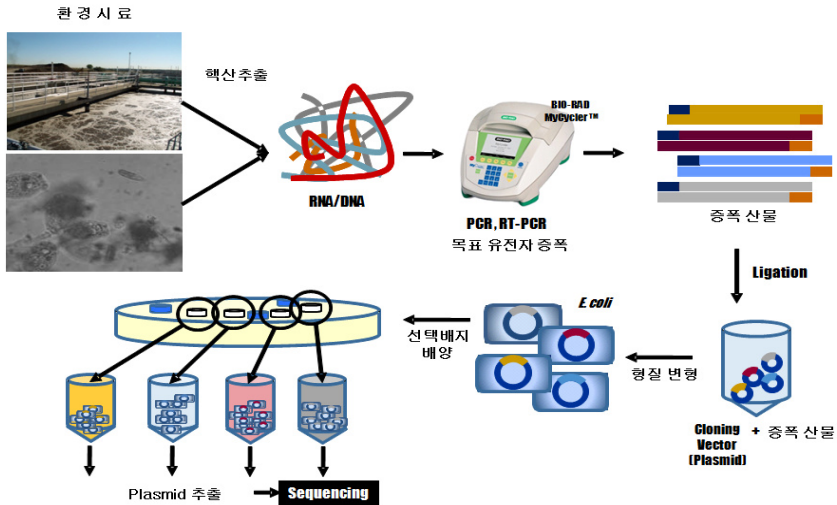


Fig. 2-9. The process of clone library

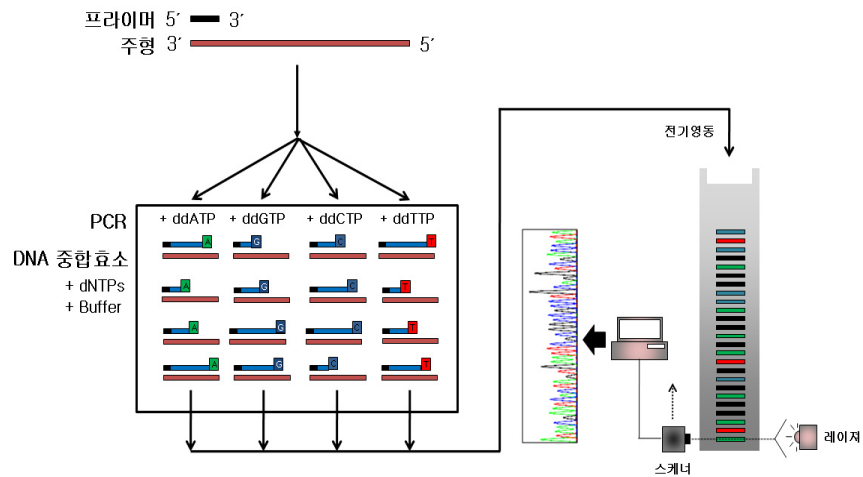


Fig. 2-10. Sequencing by Sanger methods



#### 2.3.2.6. 계통분류학적 분지도 제작

분석된 염기서열(sequencing)을 현재까지 데이터베이스에 저장된 미생물 유전자들 정보와 비교·분석하여 계통분류학적 분지도(phylogenetic tree)를 작성한다. Fig. 2-11은 실제 본 연구에서 제작된 계통분류학적 분지도이다.

염기서열분석과 계통분류학적 분지도 작성은 정밀한 정보를 제공해 주는 장점이 있어 환경 미생물을 중 단계에서 정확히 판단하고자 할 때 널리 쓰이고 있다. 계통분류학적 분지도는 분석 대상 염기서열 정보 내에서 미생물 군집간의 상관관계를 나타내는 지도다.

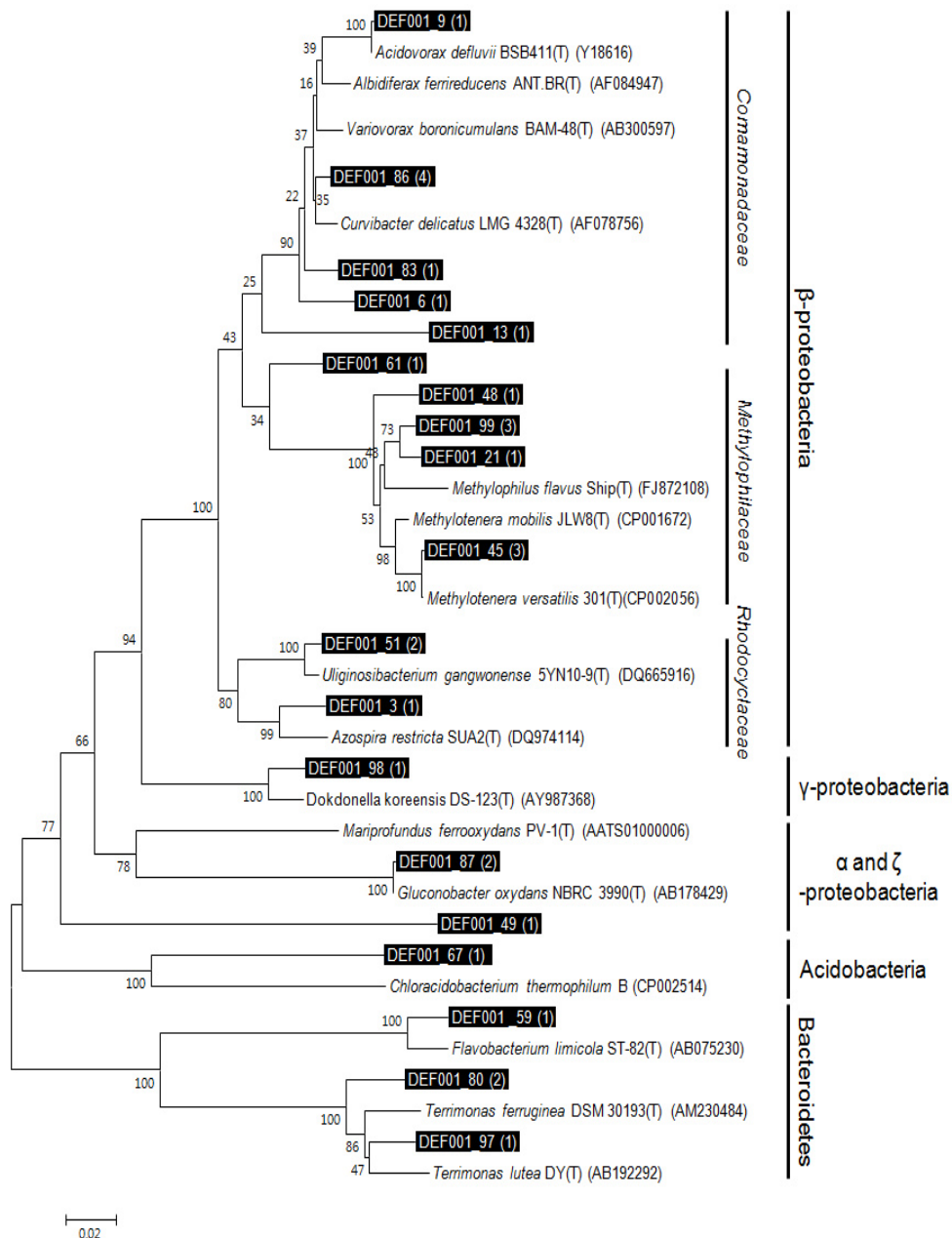


Fig. 2-11. Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences at phase I

### 3. 재료 및 방법

C하수처리장의 면적은  $7,531\text{m}^2$ (약 2,300평)이고 시설 용량은  $9,000\text{m}^3$ 일이다. 유입된 하수 원수는 침사지를 통과하여 큰 입자성 물질을 제거하고 연속회분식반응조(SBR, Sequencing Batch Reactor)에서 생물학적인 방법으로 오염 물질을 제거한다. 그 후 여과 설비(MDF, Micro Disc Filter) 및 자외선 소독을 거쳐 방류한다.

SBR 반응조는 회분식 반응조를 연속적으로 운전할 수 있도록 변형한 것으로 간헐식(intermittent) 반응조 또는 주입 배출(fill and draw)반응조라고 부르기도 한다(Manning, 1985). 오수의 유입이 일정하지 않고 고농도이며 유입 오염물질의 부하변동이 심한 소량의 오수도 잘 처리할 수 있고, 1회 반응시간은 통상 3시간에서 24시간까지 변환 가능하다.

연구를 위하여 동절기와 하절기에 SBR에 대한 방류수 수질 사전조사를 진행하였다(Table 3-1). C 하수처리장은 I 지역에 위치하고 있으며 적용되는 방류수 수질기준은 총질소가  $20\text{ mg/L}$  이하, 총인은  $2\text{ mg/L}$  이하로써 2011년까지의 수질기준을 만족하고 있었다. 그러나 2012년부터 I 지역,  $500\text{m}^3/\text{일}$  이상인 하수처리시설에 대한 동절기 총질소와 총인 방류수 수질 완화기준이 폐지됨에 따라 계절에 관계없이 총질소는  $20\text{ mg/L}$  이하, 총인은  $0.2\text{ mg/L}$  이하를 만족해야 하므로 총질소 및 총인 고도처리 공정이 필요한 시설이다.

동절기에 수온은 평균  $11^\circ\text{C}$  정도이고 총질소는 평균  $10\text{ mg/L}$ , 최고  $15\text{ mg/L}$ 로 방류하고 있다. 하절기에는 수온이 평균  $20^\circ\text{C}$  정도로 유

지되고 총질소는 평균 4 mg/L, 최고 8mg/L 정도로 배출하고 있었다.

Table 3-1. Water quality of the effluent discharged from C sewage treatment plant

	Winter season (Max.)	Summer season (Max.)
Period	2010/12/7 ~ 2011/ 3/ 27	2011/7/17 ~ 2011/10/17
Temp.(℃)	11 (13)	20 (21)
pH	7 (7)	7 (7)
BOD <sub>5</sub> (mg/L)	3 (4)	1 (3)
COD (mg/L)	13 (15)	7 (12)
SS (mg/L)	3 (4)	1 (3)
T-P (mg/L)	1 (2)	1 (1)
T-N (mg/L)	10 (15)	4 (8)

SBR은 중력 침강으로 미생물을 분리하기 때문에 미생물을 고농도로 유지하기가 어렵고, 갑작스러운 부하변동 시에 미생물 유실을 초래하게 되어 우발적으로 처리효율이 나빠질 수 있다. 반면 상향류식 유동상 반응기는 수리학적 체류시간이 훨씬 짧고 작은 규모로도 대용량의 하·폐수를 처리할 수 있기 때문에 SBR과 상호 보완적일 수 있다.



Table 3-2. Specification of the full-scale FBR

Feature	Section	Specification
FBR	Plan flow rate	1,177 m <sup>3</sup> /d (49.0 m <sup>3</sup> /hr)
	Material	FRP
	Size	D 2.7 m × H 5.5 m
	Section area	5.73 m <sup>2</sup>
	Filter height	2 m
	Quantity	2 unit
Air Compressor	Flow rate	1.27 m <sup>3</sup> /min
	Pressure	7.0~9.9 kgf/cm <sup>2</sup>
	Power	7.5 kW
	Quantity	2 unit (spare 1unit)
	Receiver Tank	0.5 m <sup>3</sup>
Influent Tank	Volume	30 m <sup>3</sup>
	Quantity	1 unit
Influent pump	Type	Centrifugal
	Capacity	0.8 m <sup>3</sup> /min (10 mH)
	Power	3.7 kW
	Quantity	4units(spares : 2units)
Chemical pump	Type	Tubing
	Capacity	82 ml/min
	Power	0.05 kW
	Quantity	6 units(spares : 2units)
Chemical tank 1	Type	Poly Ethylene, 원통 입형 탱크
	Capacity	2 m <sup>3</sup>
	Quantity	1 unit
Chemical tank 2	Type	Poly Ethylene
	Capacity	5 m <sup>3</sup>
	Quantity	1 unit
Auto sensor	Flow meter	Green Flowmeter, SSM 100×2
	Nitrate Sensor	HACH, NITRATAX plus sc×1
	DO Sensor	HACH, sc200™ Universal controller×1
	Level sensor	Quick Type Level Sensor, DQL-4F×1

### 3.1.1.2. 여재 재원

내부에 충전한 여재는 비중  $2.65\text{ton/m}^3$ , 겉보기비중  $1.69\text{ton/m}^3$  인 모래를  $24.55\text{ton}$  사용하였고 공극률 35%, 균등개수 1.29, 알갱이의 크기는  $0.963\pm0.09\text{mm}$ , 형상계수는  $1.14\pm0.150$ 이고 비표면적은  $3187.1\text{m}^2/\text{m}^3$ 였다(Table 3-3).

Table 3-3. Media Specitication of the full-scale FBR

Media	Specification	Remarks
Seeming gravity ( $\text{ton/m}^3$ )	1.69	
Specific gravity ( $\text{ton/m}^3$ )	2.65	
Containing weight in reactor (ton)	24.55	
Porocity (%)	0.35	
Specific area ( $\text{cm}^2/\text{g}$ )	23	
Uniformity coefficient	1.29	
Particle diameter $d_p$ (mm)	$0.963\pm0.09$	
Shape factor ( $\Psi$ )	$1.14\pm0.150$	
Media specific area ( $\text{m}^2/\text{m}^3$ )	3886.2	

### 3.1.1.3. 상향류식 유동상반응기의 설치 및 작동원리

실규모 상향류식 유동상반응기는 유입원수로 SBR반응조의 배출수를 사용하였다(Fig. 3-2).

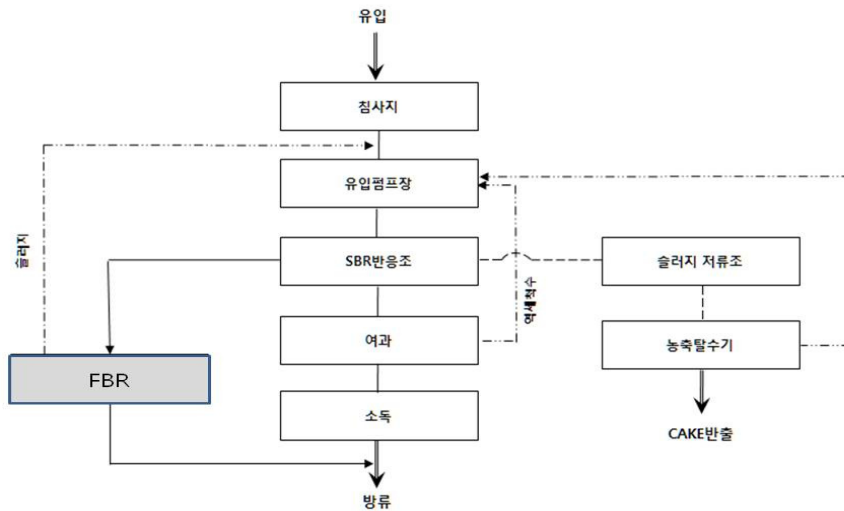


Fig. 3-2. Connected FBR with C sewage treatment plant

Fig 3-3은 용인 C 하수처리장에 설치한 상향류식 유동상반응기이다. 기본적으로 1단 처리 공정으로 운영되나 더 높은 고도처리를 위해 2단 처리 공정 운영이 가능하도록 설치하였다. 유량 조절을 위해 설치된 유입수조 용량은 30 m³이다. 오염물질 제거 후 생성된 반류수는 하수처리장 내 유량조정조로 반송되며 상향류식 유동상반응기의 처리수는 별도 추가 공정 없이 방류했고, 인위적으로  $\text{NO}_3^-$ -N 부하를 높일 때는 슬러지와 같이 유입펌프장으로 배출하였다.





Fig. 3-3. Picture of the full-scale FBR

### 3.1.2. 상향류식 유동상반응기 운전원리

설치한 반응기는 2012년 3월 5일부터 8월 24일까지 183일 동안 시험·운전하였고 초기 미생물 접종은 용인시 C하수처리장의 슬러지를 사용하였다.

본 연구에서 사용한 상향류식 유동상반응기는 하수·메탄올 혼합액 주입부와 오염물질 제거를 위한 여재 충전부, 성장한 미생물을 슬러지로 배출하는 슬러지 분리부로 구성되며 여재재생을 위한 공기압축기와 운영시스템을 갖추었고 이를 Fig. 3-4에 나타내었다.

메탄올이 2차 처리수와 혼합·분산이 잘 되도록 하고 용존산소

를 없애기 위하여 메탄올은 유량조정조에 주입한다. 메탄올이 분산된 2차처리수는 하수·메탄올 혼합액 주입부 (1)로 들어간다.

주입부 (1)로 들어온 메탄올이 분산된 2차 처리수는 배관 (2)를 거쳐 토출부가 있는 분배관 (3)을 통해 반응기 내부로 투입된다. 반응기 내부에서 상향류로 흐르면서 여재층을 거치고 이 과정에서 오염물질을 제거한 후 위어(Weir) (4)를 통해 처리수가 배출된다.

오염물질 제거를 위한 여재 충전부는 반응기의 본체로 여재로 충전되어 있다. 메탄올이 혼합된 2차 처리수가 여재층을 통과하면서 여재의 표면에 성장하고 있는 미생물과 접촉하여 오염물질이 처리된다.

충진된 여재는 지속적으로 순환하면서 유입수와 접촉한다. 여재 충전부의 여재는 표면에 부착된 미생물과 함께 하부 (a)로 이동하고 메탄올과 혼합된 2차 처리수는 상부 (3)으로 이동한다. 이동하는 여재 표면에는 미생물막이 형성되어 있다. 반응기 하층 여재에 부착된 미생물막은 상층의 여재에 부착되어 있는 미생물 막보다 체류시간이 상대적으로 길기 때문에 하층으로 갈수록 미생물개체들이 많고 성숙한 상태이다.

여재의 순환시 여재를 상부로 이송하는 동력은 압축공기다. 외부 공기를 중앙의 관(Air lift) 하부 (b)에 공급하여 중앙관을 통해 공기가 상부 (c)과 (d)가 있는 분리조로 흐르게 한다. 외부공기의 압력으로 여재충진부 하단에서 성숙한 미생물을 부착하고 있는 여재와 하수가 중앙관을 통해 지속적으로 상부의 분리조로 이송된다. 중앙관에 난류를 형성하여 하수와 여재 간, 여재와 여재 간, 압축공기와 여재 간 마찰을 일으켜 여재에 부착되어 있던 미생물이 분리된 상태로 분리조((d), (e) 부분)에 도달하게 한다.

분리조에서는 끌어올려진 하수, 비중이 물보다 작은 슬러지 그리고 비중이 물보다 큰 여재를 분리한다. 슬러지와 분리된 여재는 (d)를

[illegible]

## 3.2. 실험방법

상향류식 유동상반응기에서 질소를 효율적으로 제거하기 위해서는 생물반응기 효율에 절대적인 영향을 미치지만 조정이 불가능한 온도, 탈질효율을 높일 수 있는 운전요소(control factors)인 C/N비 그리고 용존산소를 계절별로 최적화하는 것이 중요하다.

### 3.2.1. 실험단계 분류

운전요소를 최적화하기 위해 분석 시기를 총 3가지 실험단계로 구분하였다. 운영시작부터 80일 동안을 실험단계 I (phase I), 그후 85일 동안을 실험단계 II (phase II) 그리고 그후 8일 동안을 실험단계 III (phase III)으로 구분하여 분석하였다(Table 3-4).

Hallin 등의 연구에 의하면 메탄올을 외인성 유기탄소원으로 주입하면 탈질효율이 첫째날은  $1.2\text{g NO}_3^- - \text{N/g VS} \cdot \text{d}$ 에서 50일째에는  $2.0\text{g NO}_3^- - \text{N/g VS} \cdot \text{d}$ 으로 메틸영양미생물 군집이 충분한 분해효율에 도달하기까지 50~70일에 상당하는 적응 기간이 필요하다(Hallin, S. et al., 1998).

따라서 실험규모 플랜트인데다가 동절기임을 감안하여 본 연구에서는 80일로 분석계획을 수립하였다. 이때 온도범위는  $11.8 \sim 20.1^\circ\text{C}$ 에서 실험단계 I을 다시 온도  $11.8 \sim 15^\circ\text{C}$ 구간과  $15 \sim 20^\circ\text{C}$ 로 분류하여 분석하였다.

Table 3-4. phases based on temperature

phase	Period (days)	Temp.(°C)
I	80	40 11.8~14.2
		40 15.1~20.1
II	85	20.5~27.8
III	8	25.9
Sum	173	11.8~26.8

실험단계 I 은 동절기 운전시기로 온도의 영향을 분석하는 것을 목적으로 하였으며 탈질균을 안정화시킨 시기이다. 실험단계 II 는 안정적인 운영기간이며 질산성질소의 유입량을 1.8mg/L로 부터 33mg/L까지 인위적으로 상승시킨 85일 동안이었다.

실험단계 III 은 총 8일로 적정한 용존산소의 허용한계를 파악하기 위해 메탄올 투입전 용존산소를 6~8mg/L로 과잉 공급하고, 메탄올 주입시 식 2-21의 산소항에 해당하는 양은 주입하지 않았다.

### 3.2.2. 운전 조건

시험기간 중 유량은 216~552m<sup>3</sup>/d, 반류유량은 72~264m<sup>3</sup>/d, 여재순환(Turnover rate)은 3.45와 3.69 cycle/d로, 수두손실(head loss)은 325.62±67.42mmH<sub>2</sub>O이었다(Fig. 3-5; Fig. 3-6).

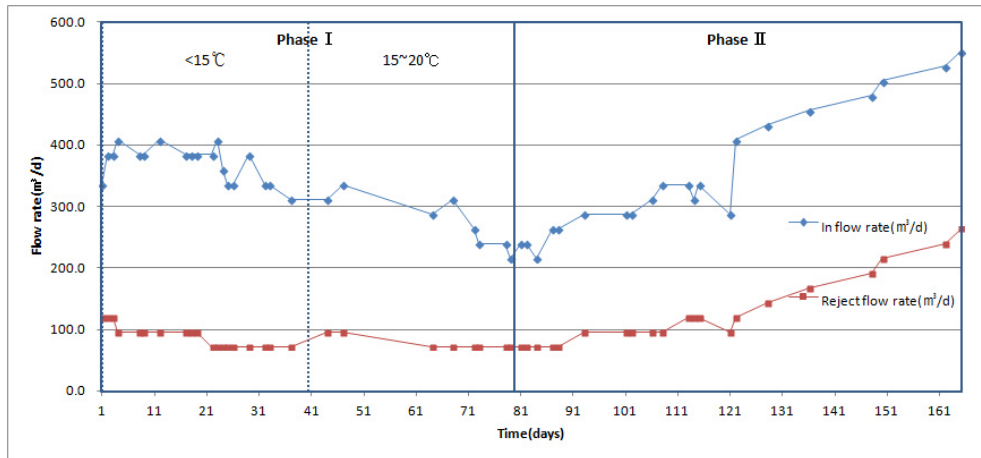


Fig. 3-5. Flow rate of influent waste water in this study

실험단계별로 각각을 구분해 보면 실험단계 I에 유량은 216~408 m³/d, 온도 15°C 이하 기간에는 312~408 m³/d로 유입되었으며, 반류유량은 유입의 25~30% 정도로 조정하였고, 여재는 1일 3.69회 순환, 수두손실은 258.2~387.3mmH<sub>2</sub>O였으며 온도 15°C 이하 기간에는 342.3~381.7mmH<sub>2</sub>O로 운전하였다.

실험단계 II에 유량은 216~552 m³/d로 유입되었으며, 반류유량은 유입의 25~40% 정도로 조정하였고, 여재는 1일 3.69회 순환시켰고 수두손실은 258.2~387.3mmH<sub>2</sub>O으로 운전하였다.

실험단계 III에 유량은 410~440 m³/d로 유입되었으며, 반류유량은 거의 없게 하였고, 여재는 1일 3.69회 순환시켰고 수두손실은 161.3mmH<sub>2</sub>O로 운전하였다(Table 3-5).

Table 3-5. Operating condition of the full-scale FBR

Condition	Max.	Min.	phase I (15℃>T)	phase II	phase III
Flow rate (m <sup>3</sup> /d)	552.0	216.0	216~408 (312~408)	216~552	410~430
Reject flow rate (m <sup>3</sup> /d)	264.0	72.0	72~120 (72~120)	72~264	1~7
Turnover rate (Cycle/d)	3.7	3.5	3.69 (3.45)	3.69	3.69
Head loss (mmH <sub>2</sub> O)	387.3	258.2	258.2~387.3 (342.3~381.7)	258.2~387.3	161.3

여재의 순환과 수두손실은 반응기의 막힘과 관련이 있다. 운영이 잘못되어 미생물이 이상 증식하거나 2차 처리수로부터 부유물질(SS)이 과다하게 유입되면 여재충전부가 막히게 된다. 또한 너무 빠르게 순환할 경우 탈질미생물이 충분하게 성장하지 못할 수도 있다.

운영기간 중 수두손실(Head loss)은  $325.62 \pm 67.42 \text{ mmH}_2\text{O}$ 로 운영하였는데 여재 충전부에 미생물이 적절하게 증식하고 있는지, 또 갑자기 많은 양의 부유물질이 유입되었는지를 간접적으로 파악할 수 있는 운전지표다. 수리학적 체류시간은 34.7~88.7min로 운영하였다(Fig. 3-6).

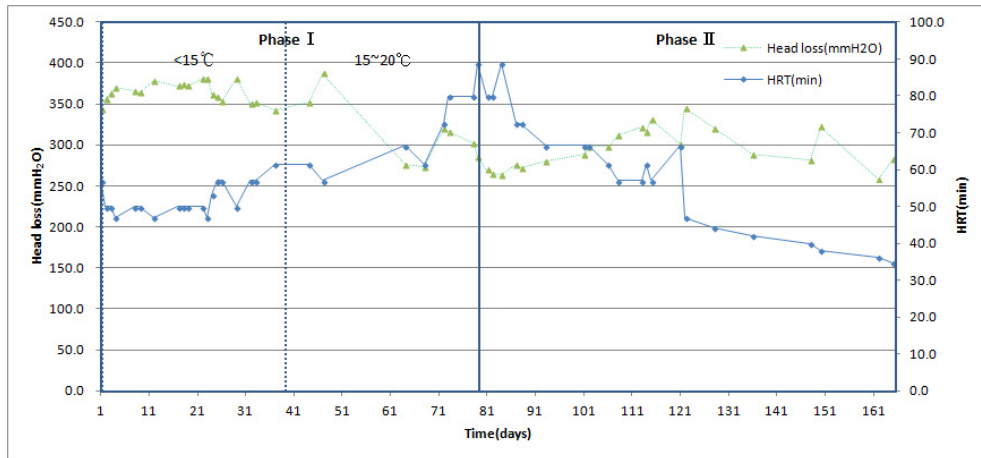


Fig. 3-6. Head loss and HRT of FBR in this study

### 3.3. 분석방법

#### 3.3.1. 제한인자 분석

유기물의 농도는  $\text{COD}_{\text{Mn}}$ 으로 standard methods (APHA, AWWA and WPCF, 1995) 방법으로 분석하였다.

유량은 on-line 자동측정기인 Green Flowmeter SSM100 (SSMI, Korea), 질산성질소는 HACH DR890 (HACH Co, USA) 과 on-line 자동측정기인 NITRATAX plus (HACH Co, USA) 를 사용하여 분석하였다. 용존산소는 HACH 200<sup>TM</sup> Universal Controller (HACH Co, USA) 를 사용하였고 온도(T)는 C하수처리장의 TMS (Telemetry system) 방류수질 자료를 사용하였다.



### 3.3.2. 우점도 분석

분자생물학적 실험은 실험단계 I의 80일 동안 3회, 실험단계 II의 85일 동안 7회, 실험단계 III의 8일 동안 1회씩 시료를 채취하여 분석하였다

우점도분석은 생활성도 평가를 통해 시료채취 위치의 적합성을 평가하였고, T-RFLP 분석으로 유전자분석 대상종의 범위를 확정하였으며 중합효소반응으로 유전자를 증폭하고 OTUs들의 우점도를 산정하였다. 이후 계통분류학적 분지도(Phylogenetic Tree)를 작성한 후, 발견된 탈질 미생물의 계통학적 상관관계와 탈질 미생물의 생화학적 특성을 조사하였다(Table 3-6).

생활성도 평가는 Live/Dead Cell Vitality Assay Kit (Invitrogen, USA)를 사용하여 미생물을 고정하고 광학 및 형광 현미경으로 관찰하였다.

Power Soil<sup>TM</sup> DNA kit (Mo Bio Laboratories Inc., USA)를 사용하여 DNA 추출하였다.

T-RFLP분석은 FAM과 HEX가 각각 결합된 27F (AGAGTTT GATCCTGGCTCAG)와 518R (ATTACCGCGGCTGCTGG)를 프라이머로, 제한효소는 *AluI*과 *TaqI*을 사용하여 2X Multiplex PCR Premix (Solgent Co., Korea)와 MyCycler(BIO-RAD Inc., USA)를 이용하여였고, 전기영동은 100 mV에서 25분, 정제는 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc., USA)를 사용하였다. Solgent Inc.에 의뢰하여 Laser Scanning을 한 후, GeneScan 소프트웨어(Applied Biosystems Inc., USA)를 이용하여 Peak Pattern을 분석하였다. T-RFLP 분석은 클로닝과 염기서열분석(Cloning and Sequencing)의 범위와 규모를 정

하기 위하여 연구초기에 2회 실시하였다.

중합효소연쇄반응(PCR)에 프라이머로 27 F (5' -AGAGTTT GATC(A/C)TGGCTCAG-3' )와 1492R (5' -GGTTACCTTTGTT ACGACTT-3' )을 사용하였으며 신장은 MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad,US)로 하였다.

분리된 DNA를 pGEM™-TEasy Vector System (Promega, US)을 이용하여 증폭하였고 증폭된 시료를 HIT™ competent cells (Real Biotech Corp.,Taiwan)에 리게이션 혼합물(ligation mixture)을 인입하여 형질을 전환했고 베타갈락시다제 발색시약 X-Gal과 외래유전자발현 촉진물질 IPTG를 이용하여 정상·발색한 클로니를 추출, 항생제 엠피실린이 있는 배지에서 배양하여 클로닝백터를 선별하였다. 선별한 클로닝백터를 플라스미드 추출(Plasmid Extraction) 과정을 거쳐 분리·정제 하였다. 증폭산물은 1,400~1,500 bp로 길이가 다양하였다.

증폭산물을 판별하고 아직은 종이 확인되지 않은 OTUs들의 우점도를 산정하였다. 이후 Mega 프로그램([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net))을 사용하여 계통분류학적 분지도를 작성하였고, 이를 통해 데이터베이스의 기준 미생물(Reference Bacteria)과 실험군에서 발견된 탈질 미생물의 계통학적 상관관계를 확정하였다.

마지막으로 작성된 계통분류학적 분지도를 통해 종 정보를 최종 판별하고 문헌조사를 통하여 탈질 미생물의 생화학적 특성을 조사하였다.

염기서열을 분석 장비는 DYEnamic ET Terminator Sequencing Kit (GEHealthCare, US)와 MegaBACE1000DNA sequencer (GE HealthCare, US)를 사용하였다.

본 연구에서 획득한 염기서열 분석결과를 EzTaxon server

(<http://www.eztaxon.org>) 데이터베이스에 현재까지 저장된 미생물 유전자들과 비교·분석하여 계통분류학적 분지도를 제작하였고, 최종적으로 Mega프로그램([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net))을 이용하여 계통분류학적 분지도를 완성하였다. OTUs (operational taxonomic units)에 대한 계통분류학적 정보 확인은 EzTaxon을 이용하였다.

16S rRNA 유전자 염기서열분석 정보는 Mothur 프로그램 V.1.7.2. ([www.mothur.org](http://www.mothur.org))을 이용하여 배열하였고 각 그룹별로 97% 이상의 상동성을 가지는 OTUs로 분류하여 클러스터링하였다.

Table 3-6. 16S rRNA analysis used in this study

구 분	실험 단계	실험 방법
생활성도 관찰	Live/Dead Cell 현미경 관찰	Live/Dead Cell Vitality Assay Kit(Invitrogen, USA)를 사용하여 미생물을 고정하고 광학 및 형광 현미경으로 관찰
	Genomic DNA 추출	Power Soil™ DNA kit(Mo Bio Laboratories Inc., USA)를 사용하여 DNA 추출
	16S rRNA gene 증폭	16s rRNA gene 분석을 위하여 형광물질이 결합된 프라이머 사용하여 유전자를 증폭 - 형광물질 FAM 결합된 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) - 형광물질 HEX 결합된 518R (ATTACCGCGGCTGCTGG)
	T-RFLP <sup>1)</sup>	형광물질이 결합된 Fragment만 분류하여 관찰하기 위하여 제한효소 <sup>2)</sup> ( <i>Alu I</i> , <i>Taq I</i> )를 사용해 DNA 절단
	T-RFs 관찰	전기영동 <sup>3)</sup> 으로 분리된 각 T-RFs를 QIAquick Gel Extraction kit(QIAGEN Inc., USA)를 이용하여 정제하고 GeneScan 소프트웨어(Applied Biosystems Inc., USA)를 이용하여 생성된 Peak 패턴을 관찰
Clone library 제작 및 Sequencing	Genomic DNA 추출	Power Soil™ DNA kit(Mo Bio Laboratories Inc., USA)를 사용하여 DNA 추출
	16S rRNA gene 증폭	16s rRNA gene 분석을 위하여 프라이머를 사용하여 유전자를 증폭 - 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) - 1492R (TACGGYTACCTTGTACGACTT)
	OTU <sup>4)</sup> 분류	Mothur 프로그램(www.mothur.org)을 사용하여 염기서열을 분석, 97% 이상 상동성을 갖는 유전자를 분류
	탈질 미생물 계통 확인	분류된 OTU는 Mega 프로그램(www.megasoftware.net)과 EzTaxon(www.eztaxon.org)을 사용하여 계통학적 분지도와 계통분류학적 정보 확보

1) T-RFLP : Terminal Restriction Fragments Length Polymorphism, 여러 시료의 복잡한 DNA를 제한효소로 특정부위를 절단하여 쪼개진 한 단위의 DNA 조각만을 분리해 크기별로 분류함으로써 미생물의 다양성 및 시료간의 미생물 군집구조 연관성 확인을 위해 사용되는 기술임.

2) 제한효소 : 여러 가지 종류의 제한 효소가 존재하며, 각각 일정한 sequence를 갖는 부분만 선택적으로 DNA를 절단함.

3) 전기영동 : 증폭시킨 유전자를 사이즈별로 분리하기 위한 장치

4) OTU : Operational Taxonomic Unit, 보통 97% 이상 상동성을 갖는 유전자를 하나의 OTU로 판단하며 계통분류학적으로 같은 종으로 분류됨.

## 4. 상향류식 유동상반응기에서 제한인자와 탈질효율

### 4.1. 최적 C/N비

용존산소가 무산소이거나 미세산소상태(micro-aerobic)이고 온도가 탈질미생물이 활성화되는 5~10℃ 이상의 상태라면 탈질 미생물에 적당한 외인성 유기탄소원을 제공해야 한다. 반응기마다 미세한 환경차이가 만드는 외인성 유기탄소원의 분산 상태와 미생물과의 접촉면적 및 접촉시간은 탈질효율뿐 아니라 유지비용에도 영향을 미친다.

유입되는  $\text{NO}_3^-$ -N을 기준으로 주입한 COD를  $\text{COD}_{\text{inf}}/\text{NO}_3^-$ - $\text{N}_{\text{inf}}$ 로, 처리된 질산성질소와 이때 소요된 COD를  $\text{COD}_{\text{used}}/\text{NO}_3^-$ - $\text{N}_{\text{removed}}$ 로 COD주입량과 함께 Fig. 4-1에 나타내었다. 실험단계 II부터 COD주입량이 증가하는 것은  $\text{NO}_3^-$ -N을 주입하여 오염부하를 높였기 때문이다. 오염부하를 높임에도 불구하고 두가지의 C/N비가 일치함을 보여준다. 이는 주입된 메탄올이 대부분 탈질에 이용되었음을 의미한다.

Karen Alexandra Bill의 연구에서 유동상 미생물반응기(MBBR, Moving Bed Bio Reactor)에서 메탄올을 탄소원으로 주입할 경우, 10~20℃ 온도조건에서 C/N비는 4.5~5.0( $\text{COD}_{\text{dosed}}/\text{NO}_3^-$ - $\text{N}_{\text{removed}}$ )이고 탈질효율은 1.4~3.0 g  $\text{NO}_3^-$ -N/ $\text{m}^3$ -d였다.

본 상향류식 유동상반응기에서는 온도 20.9~23.3℃에서 C/N비

가  $4.65 (\text{COD}_{\text{dosed}}/\text{NO}_3^- - \text{N}_{\text{removed}})$  일 때  $1.45 \text{ g NO}_3^- - \text{N}/\text{g VS} \cdot \text{d}$  였다 (Table 4-1).

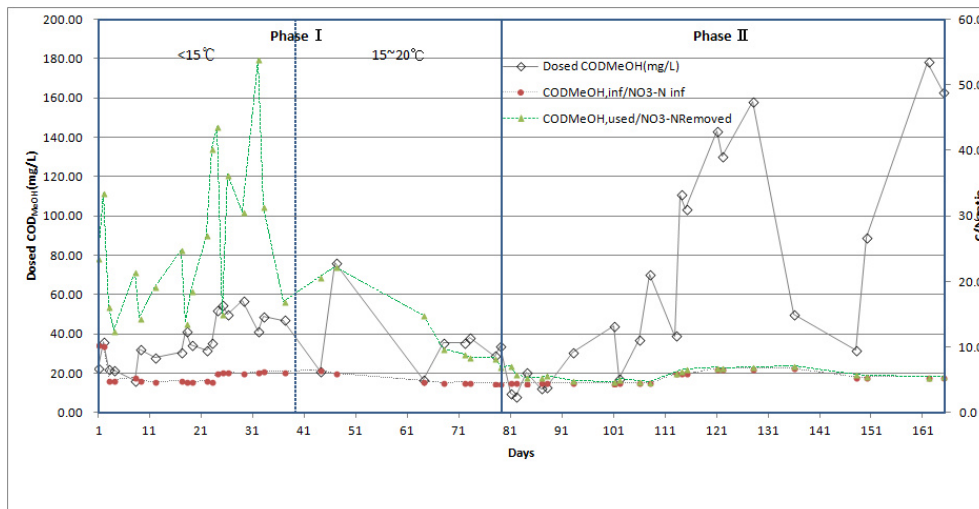


Fig. 4-1. Dosed  $\text{COD}_{\text{MeOH}}$  and C/N ratio of FBR in this study

Table 4-1. C/N ratio and  $\text{SDNR}_{\text{max}}$  on each phase

phase	Temp. ( $^{\circ}\text{C}$ )	C/N ratio ( $\text{COD}_{\text{dosed}}/\text{NO}_3^- - \text{N}_{\text{removed}}$ )	SDNR ( $\text{g NO}_3^- - \text{N}/\text{g VS} \cdot \text{d}$ )
I	11.8~15.0	13.59	0.536
	15.4~20.1	7.30	0.922
II	20.5~27.8	4.65	1.446
III	25.9	6.2	0.136

## 4.2. 온도

유입수 온도는 최저 11.8에서 27.8℃로 유입되었다. 수온은 37일(4월 10일)까지도 15℃ 이하를 유지하고 78일(5월21일)까지 20℃ 이하를 유지하고 있다(Table 4-2). Fig. 4-2를 보면 탈질효율은 온도의 함수임을 확인할 수 있다.

Table 4-2. Temperature of influent waste water

Condition	Max.	Min.	phase I (15℃>T)	phase II	phase III
Temp. (℃)	27.8	11.8	11.8~20.1 (11.8~14.2)	20.5~27.8	25.9

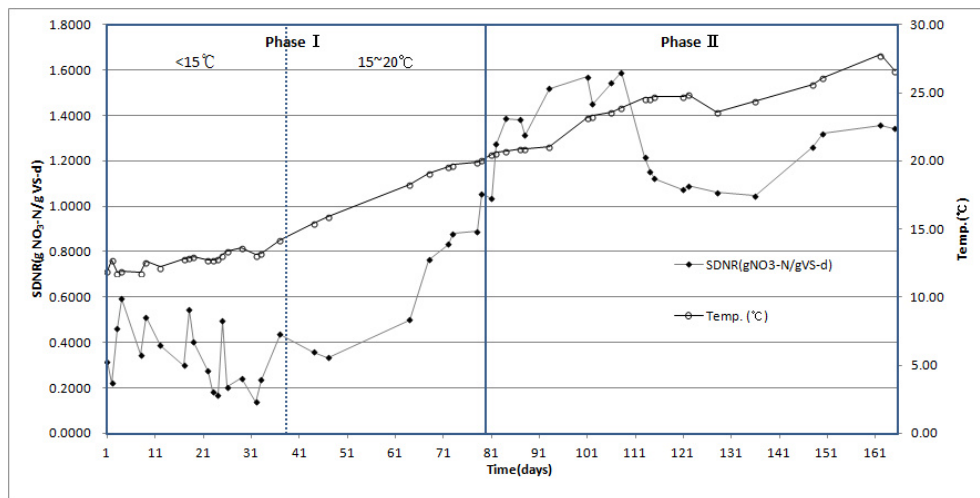


Fig. 4-2. SDNR with temperature of FBR in this study

용존산소가 무산소이거나 미세산소상태(micro-aerobic)이면서

외인성 유기탄소원이 부족하지 않게 공급된다면 탈질은 온도의 함수다.

미세산소상태에서 자료의 비교 조건을 동일하게 하기 위해 식 2-21로 환산한 메탄올 양을 1배수로 주입했을 때의 온도와 탈질효율만을 취하여 회귀분석하였다. 온도는 실험단계 I 에  $15.95 \pm 4.15^{\circ}\text{C}$ , 실험단계 II 에  $24.15 \pm 3.65^{\circ}\text{C}$ 였고 탈질효율은 실험단계 I 과 II 에 각각  $0.6201 \pm 0.4357 \text{ g NO}_3^- \text{-N/g VS} \cdot \text{d}$ 과  $1.3129 \pm 0.2780 \text{ g NO}_3^- \text{-N/g VS} \cdot \text{d}$ 이었다. 회귀분석을 통해 구한식은 식 4-1이고 Fig. 4-3에 나타내었다.

$$SDNR = 0.0743 \times e^{(0.1303 \times T)} \quad (4-1)$$

여기서 SDNR은 탈질효율( $\text{g NO}_3^- \text{-N/g VS} \cdot \text{d}$ ), T는 현재 온도( $^{\circ}\text{C}$ )이고 결정계수  $R^2$ 는 0.8214였다. 식 4-1을 식 2-23의 Arrhenius 형식으로 나타내면

$$r_{D(t)} = r_{D(20)} \times 1.1651^{T-20} + 0.02 \quad (4-2)$$

로 표현할 수 있다. 여기서  $r_{D(t)}$ 는 탈질효율( $\text{g NO}_3^- \text{-N/g VS} \cdot \text{d}$ ),  $r_{D(20)}$ 는  $20^{\circ}\text{C}$ 에서 탈질효율,  $\theta$ 는 경험적 온도상수, T는 온도( $^{\circ}\text{C}$ )이다. 즉 본 연구에서 운영한 실규모 상향류식 유동상 반응기에서는 경험적 온도상수  $\theta$ 는 1.165였다.



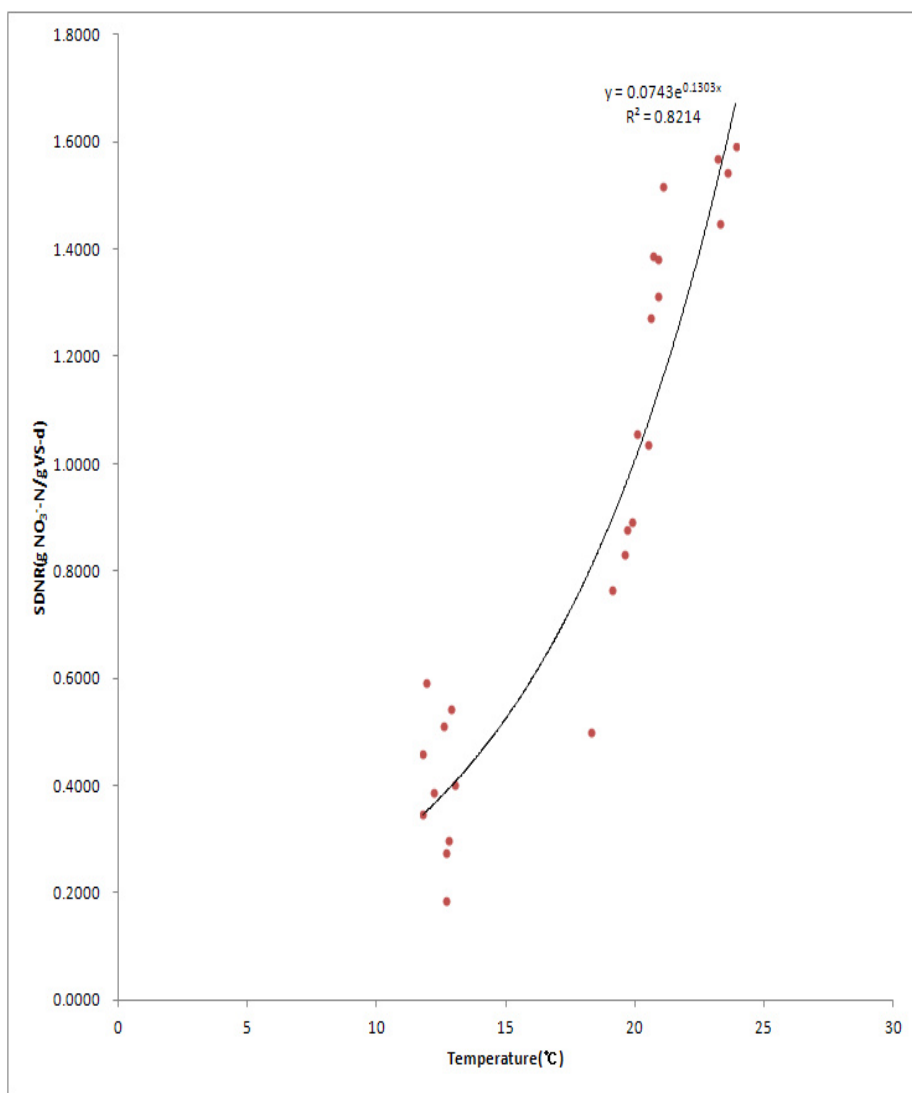


Fig. 4-3. Correlation between temperature and SDNR in the methanol dosed by formula 2-21

### 4.3. 유입 용존산소 상한

메탄올 주입 전 유입수의 용존산소는 4.2~0.9mg/L, 질산성질소는 유입이 1.8~33.0mg/L 유출이 0.1~9.10mg/L였다. 아질산성질소는  $0.02 \pm 0.01$ mg/L로 거의 존재하지 않았다(Fig. 4-4; Fig. 4-5).

유입수의 용존산소는 전단계인 SBR공정을 조정하거나 메탄올을 조기 투입하는 방법 등으로 시험조건을 다양하게 시도하였고, 질산성질소도 시험조건 조정을 위해 인위적으로 주입하기도 하였다.

실험단계별로 각각을 구분해 보면 실험단계 I에 용존산소는 0.8~3.6 mg/L, 온도 15℃ 이하 기간에는 1.4~3.6 mg/L로 유입되었으며, 질산성질소는 1.8~12.6 mg/L로 유입하여 0.1~9.1 mg/L로 배출하였고 온도 15℃ 이하 기간에는 2.2~9.4 mg/L로 유입하여 1.2~7.5 mg/L로 배출하였다. 실험단계 II에 용존산소는 0.8~1.9 mg/L로 유입하였으며, 질산성질소는 1.8~33.0 mg/L로 유입하여 0.1~1.2 mg/L로 배출하였다. 실험단계 III에 용존산소는 6.0~8.0 mg/L로 유입하였으며, 질산성질소는 12.3 mg/L로 유입하여 10.8 mg/L로 배출하였다(Table 4-3).

Table 4-3. DO and  $\text{NO}_3^-$ -N of influent waste water

Condition	Max.	Min.	phase I (15℃>T)	phase II	phase III
Influent DO (mg/L)	4.2	0.9	0.8~3.6 (1.4~3.6)	0.8~1.9	6.0~8.0
Influent $\text{NO}_3^-$ -N (mg/L)	33.0	1.8	1.8~12.6 (2.2~9.4)	1.8~33.0	12.3
Effluent $\text{NO}_3^-$ -N (mg/L)	9.1	0.1	0.1~9.1 (1.2~7.5)	0.1~1.2	10.8

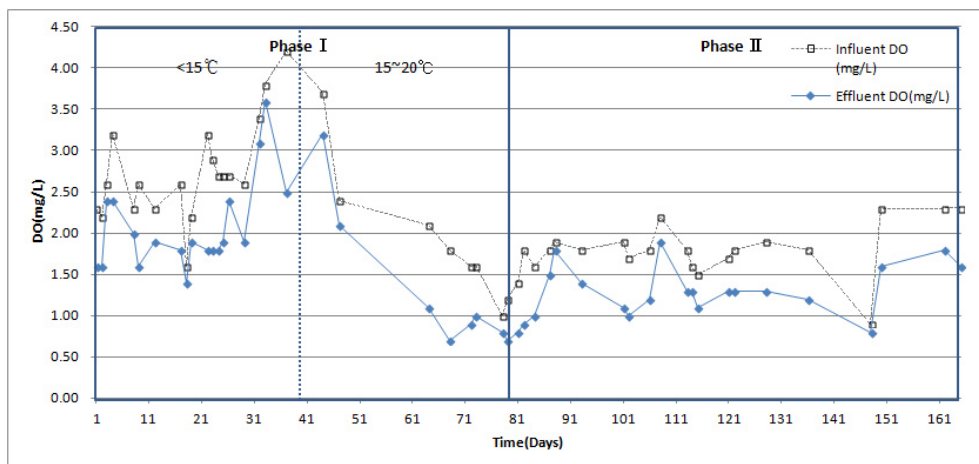


Fig. 4-4. Influent and effluent DO of FBR in this study

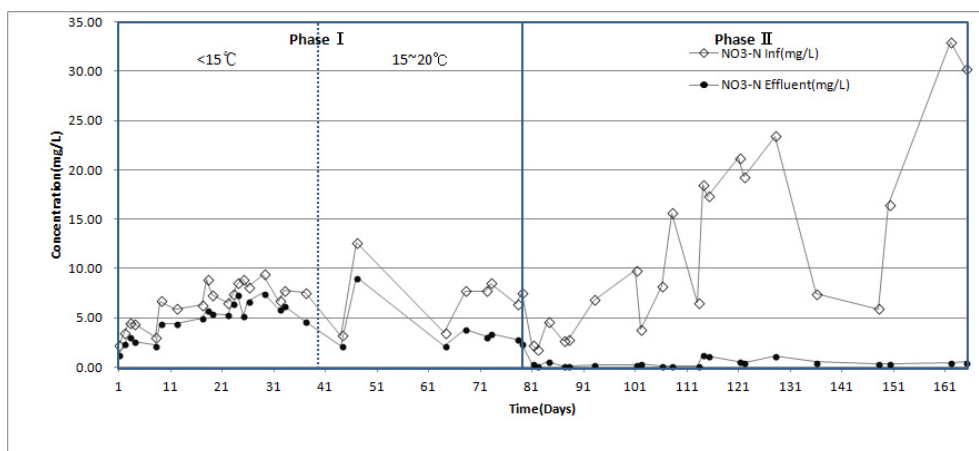


Fig. 4-5. Influent and effluent  $\text{NO}_3^-$ -N of FBR in this study

이전의 연구들에 의하면 용존산소농도는 반응기내에서 0.09~1 mg/L이어야 한다. 그러나 본 연구의 상향류식 유동상반응기는 실규모이고 상향류식 유동상반응기 내에 여재가 충전되어 있어 미생물막 주위의 용존산소를 측정하기 어려웠다. 또한 메탄올의 투입조건을 환산하기 위한 실용적인 목적으로 유입수의 용존산소농도를 측정하였다.

용존산소농도는 메탄올을 주입하기 전 유입수의 용존산소농도 자료다. 유입 용존산소는 실험단계 I 에 0.8~3.6mg/L, 실험단계 II 에 0.8~1.9mg/L였고 탈질효율은 실험단계 I 과 II 에 각각 0.184~1.056 g  $\text{NO}_3^-$ -N/g VS · d과 1.035~1.591 g  $\text{NO}_3^-$ -N/g VS · d였다(Table 4-4).

유입수중 용존산소는 메탄올에 의해 상쇄된 상태로 반응기내에 유입되어 최소한 미세산소상태(Micro aerobic condition)이거나 국지적인 무산소상태가 된 것이기 때문에 탈질반응이 있었을 것이다. 15℃ 이하의 탈질효율인 0.184~0.593g  $\text{NO}_3^-$ -N/g VS · d는 식 4-2의 온도를 고려한 탈질효율식으로 계산한 탈질효율인 0.307~0.435g  $\text{NO}_3^-$ -N/g VS · d과 차이가 있었다.

Table 4-4. DO of influent waste water and SDNR

Condition	Max.	Min.	phase I (15℃>T)	phase II	phase III
Influent DO (mg/L)	3.2	1.0	0.8~3.6 (1.4~3.6)	0.8~1.9	6.0~8.0
SDNR (g $\text{NO}_3^-$ -N/ g VS · d)	1.591	0.184	0.184~1.056 (0.184~0.593)	1.035 ~1.591	0.136
SDNR by form. 4-2	3.334	0.307	0.307~1.042 (0.307~0.435)	1.106 ~3.334	2.499

특정 온도에서 탈질효율은 온도 외에 다른 영향이 없다면 식 4-2로 산출한 값 이상이라고 가정하였다. 탈질효율이 식 4-2의 산출값보다 작다면 온도 외에 용존산소 등의 다른 요인에 의한 탈질저하도 있다고 판단하였다. 또한 상태 II의 탈질효율이 지속적으로 상승하고 있는 것은 용존산소가 안정되었기 때문으로 판단되었다. 따라서 Table 4-5에 제시한 온도대별 C/N비 이상이고 탈질효율이 식 4-2 산출값 이상인 자료들로 용존산소 상한 값을 추출한 결과 온도 15℃ 이하에서 2.7mg/L, 15.4~20.1℃에서 2.2mg/L 였고 20.5~27.8℃에서 1.9mg/L였다. 실험단계 II일 때 탈질효율이 높은 상태를 고려하면 안정적인 탈질을 위한 메탄올 주입전 유입수의 용존산소 상한은 1.9mg/L이다.

Table 4-5. C/N ratio and DO<sub>max</sub> on each phase

phase	Temp. (℃)	C/N ratio (COD <sub>dosed</sub> /NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N <sub>removed</sub> )	Influent DO <sub>max</sub> before COD mixing (mg/L)
I	11.8~14.2	17.75	2.7
	15.1~20.1	14.1	2.2
II	20.5~27.8	4.82	1.9
III	25.9	6.2	8.0

#### 4.4. 결론

본 연구에서 사용한 상향류식 유동상반응기에 대해서 질소를 제거하기 위한 C/N비는 온도 20.9~23.3℃에서 4.65(COD<sub>dosed</sub>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N<sub>removed</sub>)였고 이때의 탈질효율은 1.45 g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/g VS · d였다(Table 4-5). 또한 안정적인 탈질을 위한 메탄올 주입 전 유입수의 용존산소 상한은 1.9mg/L였기 때문에 용존산소를 이 이하로 관리할 필요가 있었다.

온도와 탈질효율간의 상관관계를 분석해서 Arrhenius식으로 표현하면  $r_{D(t)} = r_{D(20)} \times 1.1651^{T-20} + 0.02$ 였다.  $r_{D(t)}$ 는 탈질효율(g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/g VSS-d),  $r_{D(20)}$ 는 20℃에서 탈질효율,  $\theta$ 는 경험적 온도상수, T는 온도(℃)이고 상향류식 유동상반응기에서  $r_{D(20)}$ 는 1.12이고 경험적 온도상수  $\theta$ 는 1.165였다.

$r_{D(20)}$ 를 본 연구의 결과값인 1.12 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/g VSS-d로 하고 비교했을 때,  $\theta$  값은 US EPA의 1.029(US EPA, 2010a)보다는 높았지만 다른 연구결과인 1.09~1.24(Table 2-3)의 사이에 있었다. 상향류식 유동상반응기의 온도와 탈질공정과의 상관관계는 일반적인 탈질공정을 대상으로 US EPA와 Dold, P 등이 제시한 것 보다는 온도에 민감하고 Nicholas의 결과 값보다는 온도에 민감하지 않아 중간 정도의 경향을 나타내었다(Fig. 4-6).

따라서 15℃ 이하일 때는 탈질효율이 평균 0.39 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/g VSS-d, 20℃일 때는 1.12 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/g VSS-d 였으므로 오염물질 유입량이 같다고 가정하면 동절기의 수리학적 체류시간을 약 2.9배 정도로 연장하여 운전하여야 함을 알 수 있었다.

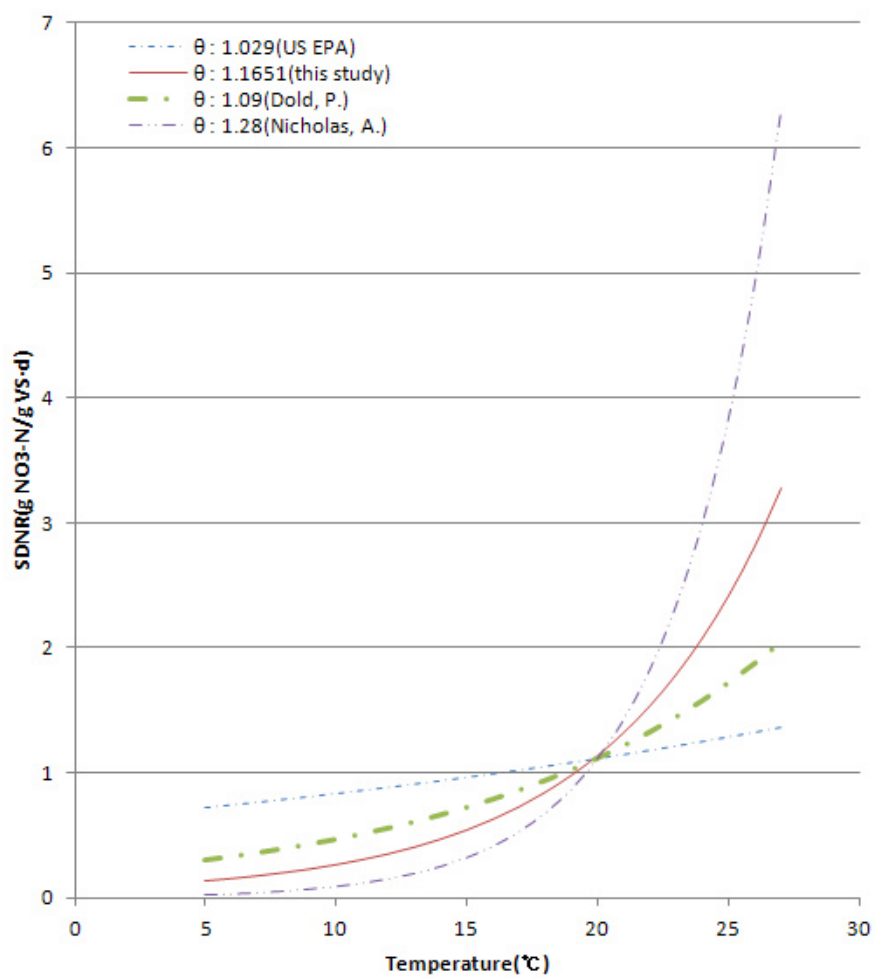


Fig. 4-6. Comparison the temperature correction factor( $\theta$ ) in this study and the others

## 5. 상향류식 유동상반응기에서

### 제한인자와 탈질균

탈질 운전요소인 용존산소와 제한인자인 온도가 변화하면 우점하는 미생물 종이 어떻게 변화하는지 상호 연관관계를 밝혀내는 것이 목적이었다. 이는 복잡한 탈질 메커니즘에서 미생물 증식환경 변화에 따라 메탄올이용 탈질 우점 미생물 군집 내에 존재하는 각각의 종이 어떻게 변화하는 지를 파악하고, 분류함으로써 미생물종을 중심으로 생물학적 탈질효율을 증대시키려는 연구에 중요한 정보를 제공한다.

본 연구에서 획득한 1,437부터 1,514bp까지 29가지 크기의 염기서열을 액세스번호(accession numbers) KF771432~KF771460으로 NCBI database에 등록하였다.

### 5.1. 생활성 평가 및 T-RFLP 분석

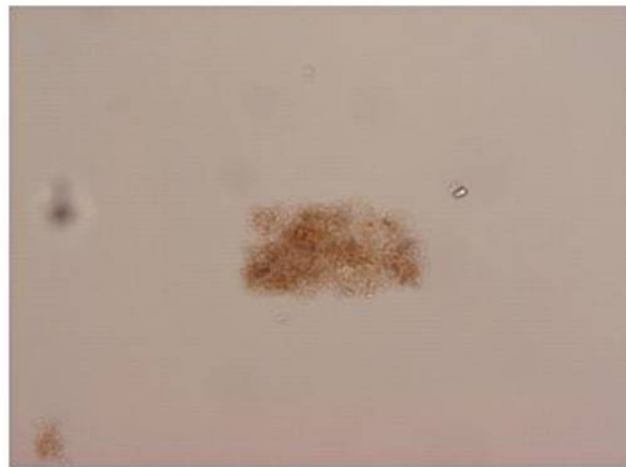
#### 5.1.1. 생활성도 평가

생존한 미생물은 녹색의 형광을 나타내고 세포막의 손상이 있는 미생물은 적색의 형광을 나타낸다.

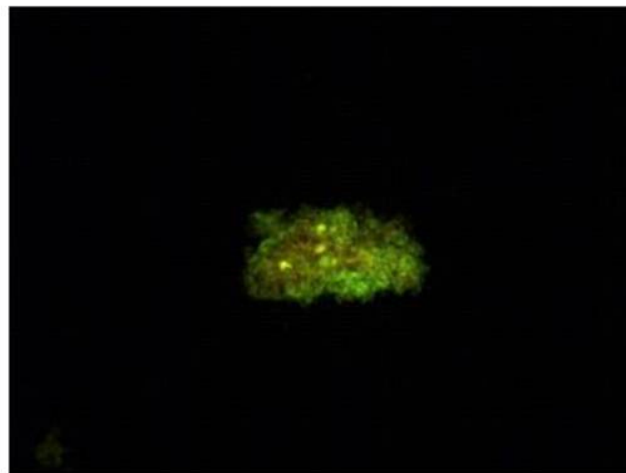
20  $\mu$ m의 소형 Floc을 대상으로 Live/Dead Cell Staining을 시행한 결과 대부분의 미생물이 녹색 형광을 나타내 활성이 높은 상태임을 확인하였다(Fig. 5-1). 상단의 사진 (a)는 광학현미경 관찰 결과이고



하단의 사진 (b)는 형광현미경 관찰결과다. 결과에 따라서 슬러지 분리조를 미생물채취 위치로 결정하였다.



(a)



(b)

Fig. 5-1. Results of Live/dead cell staining in this study

### 5.1.2. T-RFLP 분석

Fig. 5-2는 27F-FAM 형광물질에 의한 Peak Pattern을 종합한 것으로, 2012년 4월 13일에는 비교적 다양한 군집이 발견되었으며 25, 32/35, 68, 155, 185, 236 bp에 해당하는 T-RFs(Terminal Restriction Fragments)를 관찰할 수 있었다. 2012년 4월 19일에는 다소 미생물 군집이 단순해지는 경향을 나타내고 있으며 35 bp의 우점 현상을 나타내었다.

이러한 결과는 탈질 반응기의 안정화에 의해 미생물 군집이 단순화된 것을 반영한 것일 수 있으나, 탈질 기능을 가진 미생물의 분포가 다양한 것을 고려할 때에 한 가지 미생물이 우점하는 현상은 27F-FAM의 단편적인 결과에 의한 오인일 가능성이 높다. 따라서 미생물 군집 단순화 현상을 재검증하기 위하여 518R-HEX Peak Pattern을 분석하였다.

27F-FAM 말단과 518R-HEX 말단은 염기서열의 구성에 따라 제한효소에 의해 절단되는 양상(Pattern)이 다를 수 있으므로 미생물 군집 단순화현상을 쉽게 단정할 수 없다. 27F-FAM 말단이 원핵생물 중에 따라 잘 보존되어 있다면 단순한 Peak Pattern을 보이고, 변이에 의해 높은 다양성을 보인다면 다양한 Peak Pattern을 보이게 된다. Fig. 5-3 518R-HEX 단편들은 Fig. 5-2 27F-FAM에 비하여 높은 다양성을 나타내었다. 주요하게 나타난 Peak Pattern은 23, 35, 98, 221/225, 247 bp로 최소 6~15종 정도의 미생물이 우점하는 것으로 나타났다.

이러한 정보에 기반하여 클론라이브러리(Clone Library)를 대략 3~5배수로 정의하여 30~50개 정도의 염기서열을 인지하는 것을 목표

로 하여 계통분류학적 분지도(Phylogenetic Tree) 작성을 시도하였다.

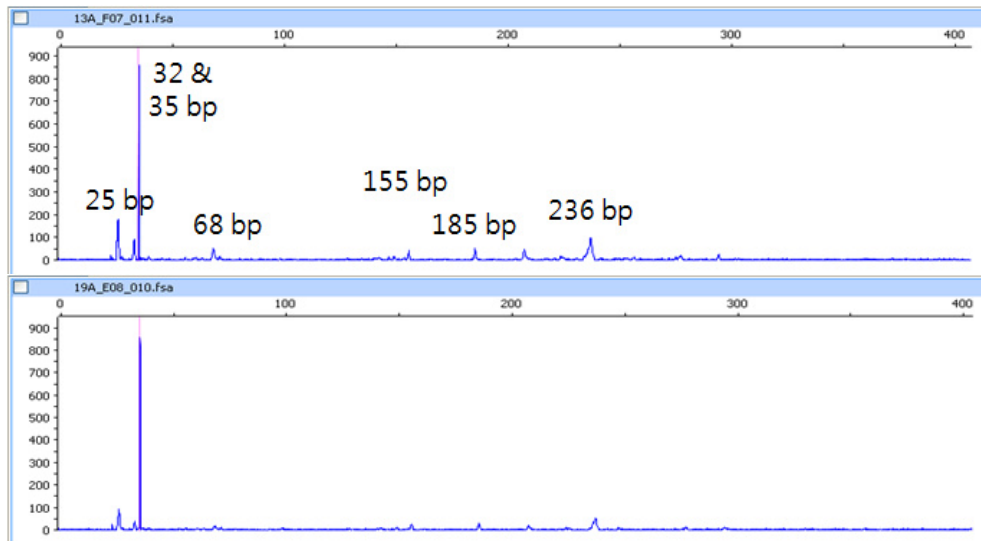


Fig. 5-2. Results of 27F-FAM analysis in this study

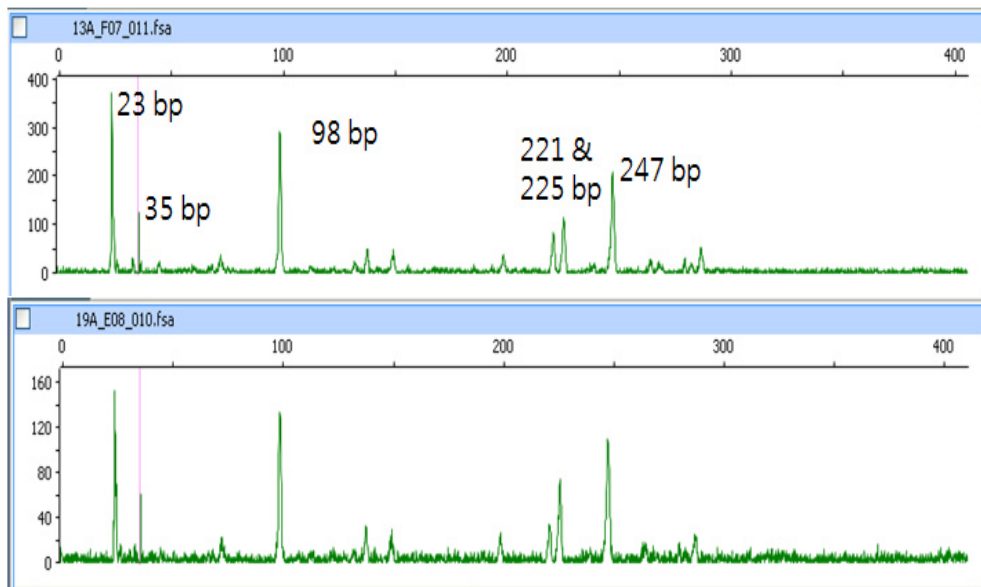


Fig. 5-3. Results of 518R-HEX analysis in this study

## 5.2. 우점도 및 생화학적 특성

미생물의 유전자분석 결과, 우점도에 따라 1% 이하의 아주 작은 우점을 나타내거나 97% 이하의 유사도를 보이는 종은 제외하고 7문(Phylum), 11목(Order), 24 종을 선별하였다. 선별한 미생물은 일반적으로 알려진 탈질미생물과 Methylophilales 그리고 기타 미생물 막을 형성하는 사상균 등으로 구성되어 있었으며 이를 Table 5-1에 정리하였고 분석과정에서 획득한 1,437부터 1,514bp까지 29가지 크기의 염기서열을 액세스번호(accession numbers) KF771432~KF771460으로 NCBI 데이터베이스에 등록하였다.

전체적으로 Proteobacteria가 74.1~81.4%를 차지하여 가장 우점하였으며, Bacteroidetes는 정상적으로 탈질이 진행되는 실험단계 I, II에서 각각 18.6%, 24.1%의 상대적 우점하였으나 실험단계 III에서는 발견되지 않았다.

Proteobacteria내의 하위분류로  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -proteobacteria가 발견되었다. 미생물군집은 실험단계 I 일 때  $\alpha$ -proteobacteria가 5.74%,  $\beta$ -proteobacteria가 74.3%로 우점인 반면, 안정기인 실험단계 II에서는  $\alpha$ -proteobacteria가 32%,  $\beta$ -proteobacteria가 34%로 거의 같은 상대적 우점도를 나타냈다.

$\alpha$ -proteobacteria에는 Rhodospirillales와 Hyphomicrobiaceae가 존재했으며,  $\beta$ -proteobacteria에 속하는 미생물로는 Burkholderiales, Rhodocyclales, Methylophilales 목이 발견되었다.  $\gamma$ -proteobacteria에는 Xanthomonadales,  $\delta$ -proteobacteria에서는 Myxococcales가 발견되었다. Bacteroidetes로는 Flavobacteriales와 Sphingobacteriales, Chloroflexi 문에 속하는 Anaerolineales, Nitrospirae and

Deinococcus-Thermus 목에 속하는 Nitrospirales가 각각 존재하고 있었다.

이중 일반적인 탈질미생물 외에 메탄올을 외인성 유기탄소원에 의하여 선택적으로 적응된 미생물 군집은  $\alpha$ -proteobacteria와  $\beta$ -proteobacteria이며, 그 중에서도 판별된 Burkholderiales, Methylophilales 목이 탈질과 직접적인 상관관계를 가지고 있었다.

특히 Methylophilales는 전체 군집의 11.8~34.3%를 차지하고 있는 가장 우점도가 높은 목(Order)이었고, 이 중에는 *Methylostenella versatilis*, *Methylostenella mobilis*, *Methylobacillus glycogenes* 와 *Methylophilus flavus*로 종을 구성하고 있다.

Table 5–1. Phylogenetic information of OTUs

Order level (Phylum)	Species & Strain Name (OTU)	Size	ID	Access No.	Relative abund. (%)		
					phase I	phase II	phase III
Rhodospirillales ( $\alpha$ -proteobacteria)	<i>Gluconobacter oxydans</i> NBRC3990(T)	1445	DEF001_87, 75	AB178429	5.74	-	-
Hyphomicrobiaceae ( $\alpha$ -proteobacteria)	<i>Hyphomicrobium facile</i> subsp. <i>Facile</i> IFAMH-526(T)	1447	DEN11_10	Y14309	-	32.02	8.30
$\alpha$ -proteobacteria sum					5.74	32.02	8.30
Burkholderiales ( $\beta$ -proteobacteria)	<i>Curvibacter delicatus</i> LMG4328(T)	1484	DEF001_6	AF078756	18.57	1.78	25.00
	<i>Acidovorax defluvii</i> BSB411(T)	1494	DEF001_9	Y18616	1.41	-	8.30
	<i>Albidiferax ferrireducens</i> ANT.BR(T)	1492	DEF001_83	AF084947	1.41	-	-
	<i>Variovorax boronicumulans</i> BAM-48(T)	1496	DEF001_61	AB300597	1.41	-	-
	<i>Azonexus fungiphilus</i> BS5-8	1500	DEN9-13	AF011350	-	20.46	16.70
	sum				22.80	22.25	50.00
Rhodocyclales ( $\beta$ -proteobacteria)	<i>Ferribacterium limneticum</i> cda-1(T)	1496	DEF001_7	Y17060	4.28	-	-
	<i>Uliginosibacterium gangwonense</i> 5YN10-9(T)	1482	DEF001_51, 31	DQ665916	8.60	-	-
	<i>Azospirarestricta</i> SUA2(T)	1501	DEF001_3	DQ974114	4.28	-	-
	sum				17.16	-	-
Methylophilales ( $\beta$ -proteobacteria)	<i>Methylotenera versatilis</i> 301(T)	1499	DEF001_93, 45, 22	CP002056	5.74	-	-
	<i>Methylotenera mobilis</i> JLW8(T)	1500	DEF001_79, 99, 12	CP001672	22.89	9.48	-
	<i>Methylobacillus glycogenes</i> DSM5685(T)	1501	DEF001_25	FR733701	1.41	-	-
	<i>Methylophilus flavus</i> Ship(T)	1501	DEF001_21	FJ872108	4.28	2.32	-
	sum				34.32	11.80	-
Xanthomonadales ( $\gamma$ -proteobacteria)	<i>Dokdonella koreensis</i> DS-123(T)	1514	DEF001_98	AY987368	1.41	3.09	-
Myxococcales ( $\delta$ -proteobacteria)	<i>Chondromyces apiculatus</i> Cma14	1512	DEN12_13	AJ233938	-	4.93	16.70
	<i>Cystobacter velatus</i> DSM14718(T)	1518	DEN12_3	DQ768115			
	<i>Haliangium tepidum</i> SMP-10(T)	1428	DEN11_12	AB062751			
Flavobacteriales (Bacteroidetes)	<i>Flavobacterium limicola</i> ST-82(T)	1475	DEF001_59	AB075230	4.28	-	-
Sphingobacteriales (Bacteroidetes)	<i>Terrimonas ferruginea</i> DSM30193(T)	1492	DEF001_80, 5	AM23048	10.02	3.29	-
	<i>Terrimonas lutea</i> DY(T)	1492	DEF001_97	AB192292	4.28	1.93	-
	<i>Candidatus Aquirestis calciphila</i> MS-Falk1-L	1478	DEN5_11,DEN 11_6,DEN3_2	AJ786341	-	18.88	-
Bacteroidetes sum					18.58	24.10	-
Anaerolineales (chloroflexi)	<i>Levilinea. Levilineas accharolytica</i> KIBI-1	1475	DEN12_7	AB109439	-	1.82	8.30
Nitrospirales (Nitrospirae and Deinococcus-Therm us)	<i>Nitrospira defluvii</i>	1500	DEN12_12, 12_5(2)	DQ059545	-	-	16.70

### 5.2.1. 실험단계별 우점도

#### 5.2.1.1. 실험단계 I

Proteobacteria내 미생물군집은  $\alpha$ -proteobacteria가 5.74%,  $\beta$ -proteobacteria가 74.3%로 우점을 보이고 있다(Table 5-2; Fig. 5-4).

$\alpha$ -proteobacteria에는 Rhodospirillales가 5.7%,  $\beta$ -proteobacteria에 속하는 Burkholderiales 22.8%, Rhodocyclales 17.2%, Methylophilales 34.3%로 Methylophilales는 전체적으로 가장 높은 우점도를 보이고 있었다. 또한 Xanthomonadales 1.4%, Bacterioidetes 18.6%중 Flavobacteriales 4.3%, Sphingobacteriales 14.3%로 분석되었다.

$\beta$ -proteobacteria를 보면 Burkholderiales 중에는 *Curvibacter delicatus*가 18.57%로 우점중이고, Rhodocyclales 중에는 *Uliginobacterium gangwonense*가 8.6%이고, Methylophilales 중에는 *Methylostenella mobilis*가 22.9%로 우점하면서 전체 종중에서도 가장 우점하고 있음을 알 수 있다.

Bacterioidetes중에는 Sphingobacteriales에서 *Terrimonas ferruginea*가 10.0%를 점하고 있었다.

Table 5–2. Bacterial community structure of the methylotrophic denitrification consortium in phase I

Phylum	Order	Relative abund. (%)
$\alpha$ –proteobacteria	Rhodospirillales	5.74
$\beta$ –proteobacteria	Burkholderiales	22.80
	Rhodocyclales	17.16
	Methylophilales	34.32
$\gamma$ –proteobacteria	Xanthomonadales	1.41
Bacteroidetes	Flavobacteriales	4.28
	Sphingobacteriales	14.30



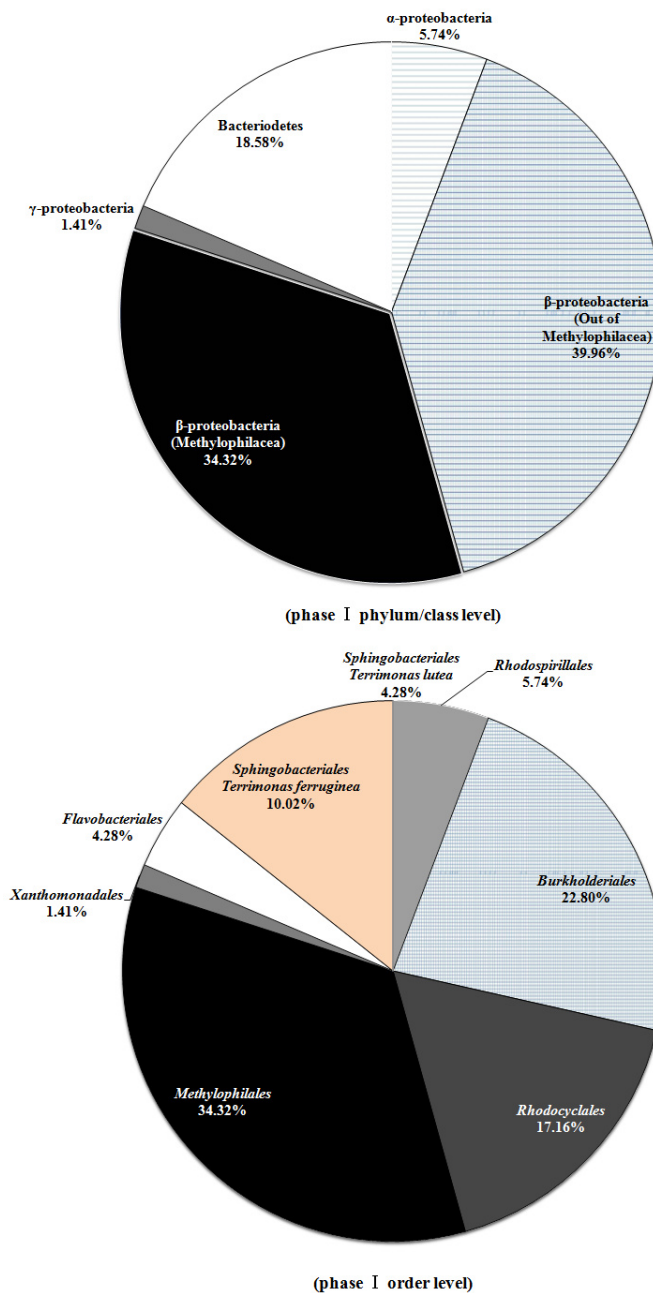


Fig. 5-4. Bacterial community structure of the methylotrophic denitrification consortium on phylum/class levels and order level in phase I

#### 5.2.1.2. 실험단계 II

Proteobacteria내 미생물군집은  $\alpha$ -proteobacteria가 32.0%,  $\beta$ -proteobacteria가 34.0%로 우점을 보이고 있음을 알 수 있다 (Table 5-3; Fig. 5-5).

$\alpha$ -proteobacteria에는 Hyphomicrobiaceae가 32.0%로 전체적으로 가장 높은 우점도를 보이고 있다.  $\beta$ -proteobacteria에 속하는 Burkholderiales 22.3%, Methylophilales 11.8%였다. 또한 Xanthomonadales 3.1%, Myxococcales 4.9%, Bacterioidetes는 Sphingobacteriales가 24.1%로 분석되었다.

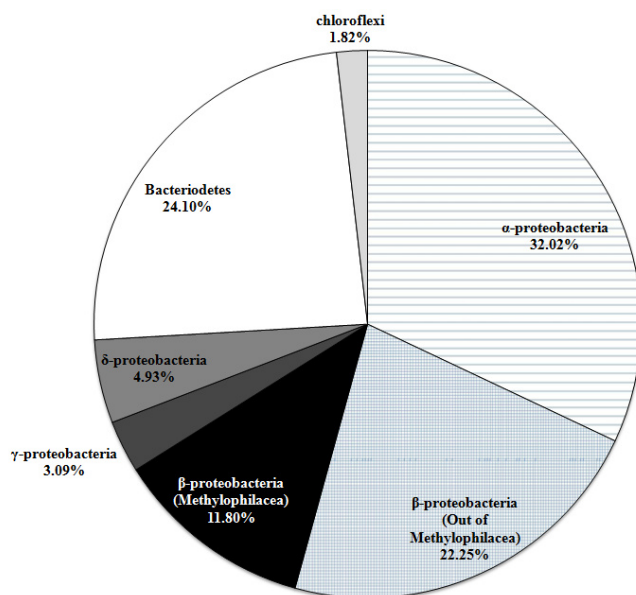
$\alpha$ -proteobacteria내 *Hyphomicrobium facile* subsp. *Facile*은 32.0%로 전체 중중 가장 우점하는 종이었고,  $\beta$ -proteobacteria를 보면 Burkholderiales중에 *Azonexus fungiphilus* 종이 20.5%, Methylophilales중에는 *Methylostenella mobilis*가 9.5%로 우점하고 있음을 알 수 있다.

Bacterioidetes중에는 Sphingobacteriales의 *Candidatus Aquiristis calciphila*가 18.9%를 점하고 있었다.

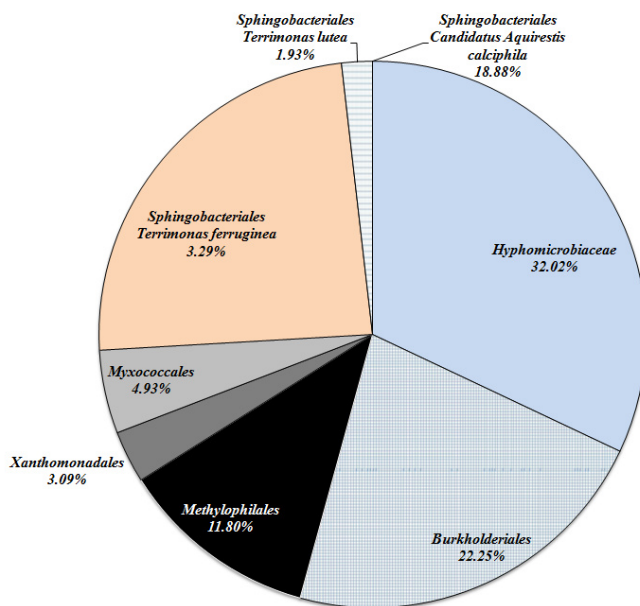
실험단계 I에서는 매우 다양한 종들이 경쟁하고 있었으나 실험단계 II에서는 몇몇 종들로 단순해지는 경쟁이 끝난 상태다.

Table 5–3. Bacterial community structure of the methylotrophic denitrification consortium in phase II

Phylum	Order	Relative abund. (%)
$\alpha$ –proteobacteria	Hyphomicrobiaceae	32.02
$\beta$ –proteobacteria	Burkholderiales	22.25
	Methylophilales	11.80
$\gamma$ –proteobacteria	Xanthomonadales	3.09
$\delta$ –proteobacteria	Myxococcales	4.93
Bacteroidetes	Sphingobacteriales	24.10
chloroflexi	Anaerolineales	1.82



(phase II phylum/class level)



(phase II order level)

Fig. 5–5. Bacterial community structure of the methylotrophic denitrification consortium on phylum/class levels and order level in phase II

### 5.2.1.3. 실험단계 III

Proteobacteria내 미생물군집은  $\alpha$ -proteobacteria가 8.3%,  $\beta$ -proteobacteria가 50.0%로 우점을 보이고 있음을 알 수 있다(Table 5-4; Fig. 5-6).

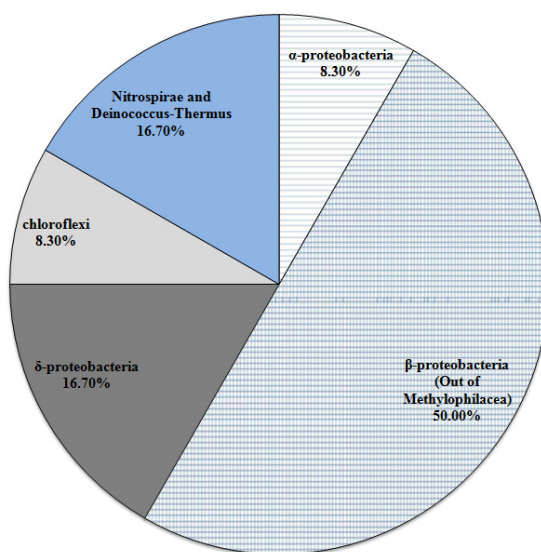
$\alpha$ -proteobacteria에는 Hyphomicrobiaceae가 8.3%,  $\beta$ -proteobacteria에 속하는 Burkholderiales 50.0%로 전체적으로 가장 높은 우점도를 보이고 있다. 또한 Myxococcales 16.7%, Anaerolineales 8.3%, Nitrospirales는 16.7%로 분석되었다.

$\alpha$ -proteobacteria내 *Hyphomicrobium facile subsp. Facile*가 8.3%, Burkholderiales중에 *Curvibacter delicatus* 종이 25.0%로 전체 종중에 가장 우점하였으며, Methylophilales는 존재하지 않았음을 알 수 있다.

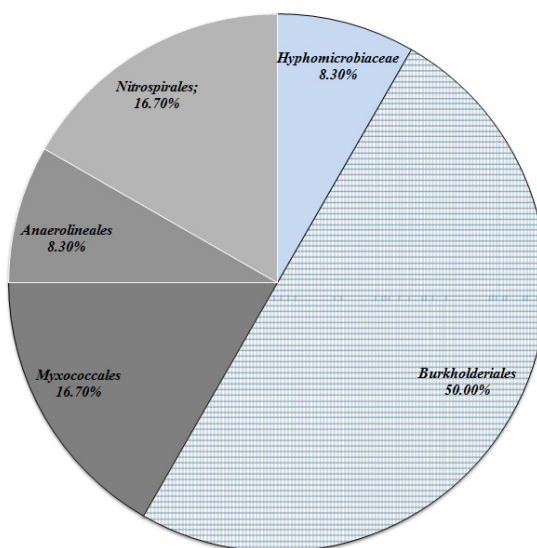
특이한 것은 Nitrospirales에 속하는 *Nitrospira defluvii*가 16.7%로 우점하고 있다. 실험단계 II에서 안정되었던 몇몇 종들이 사라지고 새로운 종들이 우점하면서 종들이 더욱 단순한 상태를 보인다.

Table 5-4. Bacterial community structure of the methylotrophic denitrification consortium in phase III

Phylum	Order	Relative abund. (%)
$\alpha$ -proteobacteria	Hyphomicrobiaceae	8.30
$\beta$ -proteobacteria	Burkholderiales	50.00
$\delta$ -proteobacteria	Myxococcales	16.70
chloroflexi	Anaerolineales	8.30
Nitrospirae and Deinococcus-Thermus	Nitrospirales	16.70



(phase III phylum/class level)



(phase III order level)

Fig. 5-6. Bacterial community structure of the methylotrophic denitrification consortium on phylum/class levels and order level in phase III

## 5.2.2. 미생물의 생화학적 특성

### 5.2.2.1. proteobacteria 그룹

#### 5.2.2.1.1. $\alpha$ -proteobacteria 그룹

가장 우점하고 있는 미생물은 *Hyphomicrobium facile* subsp. *facile* IFAM H-526(T)이고 모든 샘플에서 발견된 미생물이다. 이 미생물은 메탄올을 기반으로 한 탈질기능을 가지고 있다.

따라서 공정 안정화 이후에 탈질에 주요한 역할을 하는 미생물로 정의할 수 있으며 최적화에 집중해야하는 미생물이다. 또한 *Hyphomicrobium* sp.는 Halomethane류와 Methyl Sulphate, Methylated phosphate류의 C-1 Organic Carbon 물질을 처리하는 데 이용되어 왔다(Rainey, 1998; 계통학적분류도 Fig. a-1).

#### 5.2.2.1.2. $\beta$ -proteobacteria 그룹내 Methylophilales 미생물 군

메탄올을 이용하여 탈질을 수행하는 중요한 탈질 기능 미생물 군이다. Methylophils는 매우 다양한 미생물 군집으로 이루어져 있고 C-1 Organic Carbon을 가지는 탄소기질을 섭취하는 특성을 가지고 있다(Fig. a-2).

*Methylophilus* *versatilis* 유전정보에 대한 연구결과 동화적 질산환원(Assimilatory Nitrate Reduction)에 의해  $\text{NO}_3^-$ 를 환원하는 유전정보를 가지고 있다(Lapidus, 2011).  $\text{NO}_3^-$ 의 환원은 탈질과 구분되어야 하는데, *Methylophilus* *versatilis*는 질산으로부터 질소원을 얻기 위한 경로(Pathway)로 질산염을 암모니아로 환원시킨다. 이런 종류의 질산성질소 환원효소는 산소에 민감하지 않다(Kalyuzhnaya, M.G. et al., 2008). 이들이 최대의 우점종이 된 것은 메탄올을 이용할 수 있고,

질산을 질소원으로 활용가능하기 때문이다.

*Methylothermobacter mobilis*는 *Methylothermobacter versatilis*와 유사한 종으로써 계통분류학적으로 매우 가깝게 위치하고 있다. *Methylothermobacter mobilis*는 그러나 2009년 다시 발표한 연구결과에 의하면  $\text{NO}_3^-$ 가 존재하는 조건에서 메탄올을 이용하여 탈질반응과 함께 성장할 수 있는 것으로 밝혀졌으며 탈질 반응에 의한  $\text{N}_2\text{O}$ 의 발생이 측정되었다 (Kalyuzhnaya, 2009; 2012).

또한 Mustakhimov 등은 *Methylothermobacter mobilis*의 탈질 경로를 제시하였다(Mustakhimov, 2013). 제시한 탈질경로에 의하면 *Methylothermobacter mobilis*는  $\text{N}_2$ 를 생산하는 완벽한 형태의 탈질이 아닌  $\text{N}_2\text{O}$ 를 생산하는 불완전한 형태의 탈질을 한다.

*Methylothermobacter mobilis*에게 무산소 조건은 메탄올과 반응시 필요한 환경이지 질산성질소와 반응에 필요한 환경은 아니며, 비록 탈질이 *Methylothermobacter mobilis*에게 중요한 물질대사작용은 아니지만, 미세 산소상태(micro-aerobic conditions)에서는 탈질이 필수적인 경로다 (Beck, et al., 2011).

*Methylothermobacter mobilis*와 유사한 종류의 *Methylothermobacter* sp. 들은 성장을 위해 질산을 필요로 하며  $\text{NO}_3^-$ -N을 분해할 때 혐기성 상태를 선호하기는 하지만, 산소가 존재하는 미세산소상태(Micro aerobic condition)에서도 탈질 기능을 나타냈으며 *Methylobacillus*와 *Methylophilus* sp.가 주요한 탈질 미생물이다(Ginige et al., 2004).

#### 5.2.2.1.3. $\beta$ -proteobacteria 그룹내 Methylophilales 이외

*Curvibacter delicatus* LMG 4328(T)와 *Aquaspirillum* sp.는 탈질반응기에서 매우 흔히 발견되고 우점도가 20-30%에 이른다고 발



표한 바 있다(Thomsen, 2007; Fig. a-3).

#### 5.2.2.1.4. $\gamma$ -proteobacteria 그룹과 $\delta$ -proteobacteria 그룹

$\gamma$ -proteobacteria,  $\delta$ -proteobacteria 그룹은 전체 군집 중에 매우 소수를 차지하고 있었으며 이들에 대한 탈질 기능에 대한 연구결과는 없는 것으로 조사되었다(Fig. a-4; Fig. a-5).

#### 5.2.2.2. Bacteroidetes 문과 Chloroflexi 문

이들 중 *Candidatus Aquirestis calciphila* MS-Falk1-L은 사상균으로 생물막(Biofilm Structure)을 형성하는데 역할을 한다(Schauer et al., 2005). Chloroflexi도 대부분 사상균으로 이루어져 있고 전통적으로 무산소미생물 그라놀 구조체(Anaerobic Granule Structure)를 형성하는 미생물이다(Yamada, 2005). 이들은 생물막을 형성하는 구조체를 제공하는 중요한 미생물이다(Fig. a-6; Fig. a-7).

#### 5.2.2.3. Nitrospirae and Deinococcus-Thermus Phylum

Nitrospirae 문(Phylum)에 속하는 *Nitrospira defluvii*는 활성슬러지에서 발견되는 아질산성질소 산화미생물(NO<sub>2</sub>-Oxidizing Bacteria)이다. 이 미생물은 호기 조건에서 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>를 산화하는 기능을 가지는 미생물이므로 탈질과의 연관은 없다(Spieck et al., 2006; Fig. a-8).

#### 5.2.2.4. 그밖의 미생물

위에서 언급된 미생물 이외에도 우점도는 낮지만 *Acidovorax defluvii* BSB411(T), *Dokdonella koreensis* DS-123(T), 저온탈질균

인 *Flavobacterium limicola* ST-82(T) (Tamaki et al., 2003), *Terrimonas ferruginea* DSM 30193(T), *Terrimonas lutea* DY(T) 등 다양한 탈질 미생물이 발견되었다.

### 5.2.3. 탈질 우점균

미생물에 대한 생화학적 특징을 조사한 결과로 총 11종의 탈질 미생물을 발견하였다.

탈질미생물은 계통분류학적으로 다양하고  $\alpha$ -proteobacteria와  $\beta$ -proteobacteria에서 흔하게 발견된다(Zumft, W.G., 1997). 본 연구에서는  $\alpha$ -proteobacteria내에서는 Hyphomicrobiaceae인 *Hyphomicrobium facile* subsp. *Facile* IFAMH-526(T),  $\beta$ -proteobacteria내에서는 Burkholderiales인 *Curvibacter delicatus* LMG4328(T), *Acidovorax defluvii* BSB411(T), Methylophilales인 *Methylothenera versatilis* 301(T), *Methylothenera mobilis* JLW8(Tv), *Methylobacillus glycogenes* DSM5685(T), *Methylophilus flavus* Ship(T),  $\gamma$ -proteobacteria내에서는 Xanthomonadales인 *Dokdonella koreensis* DS-123(T), Bacteroidetes내에서는 Flavobacteriales인 *Flavobacterium limicola* ST-82(T), *Sphingobacteriales* (Bacteroidetes) *Terrimonas ferruginea* DSM30193(T), *Terrimonas lutea* DY(T) 등이 발견되었다. 일반 탈질미생물뿐 아니라 불완전한 탈질미생물인 Methylophilales도 탈질미생물 분류에 넣고 종별, 실험단계별 우점도를 Table 5-5로 정리하였다.

Methylophilales를 제외한 일반적인 탈질미생물은 실험단계 I

(<15℃)에 40.05%, 실험단계 II에 42.11% 그리고 실험단계 III에 41.6%의 우점도를 나타내었다. Methylophilales는 실험단계 I (<15℃)에 34.32%, 실험단계 II에 11.80% 그리고 실험단계 III에 0.00%로 나타났다.

Table 5-5. Denitrifiers and Methylophilales found in FBR

Order level (Phylum)	Species & Strain Name (OTU)	Relative abund. (%)		
		phase I	phase II	phase III
Hyphomicrobiaceae (α-proteobacteria)	<i>Hyphomicrobium facile</i> subsp. <i>Facile</i> IFAMH-526(T)*	-	32.02	8.30
Burkholderiales (β-proteobacteria)	<i>Curvibacter delicatus</i> LMG4328(T)*	18.57	1.78	25.00
	<i>Acidovorax defluvii</i> BSB411(T)*	1.41	-	8.30
Methylophilales (β-proteobacteria)	<i>Methylostenobacillus versatilis</i> 301(T)	5.74	-	-
	<i>Methylostenobacillus mobilis</i> JLW8(T)	22.89	9.48	-
	<i>Methylobacillus glycogenes</i> DSM5685(T)	1.41	-	-
	<i>Methylophilus flavus</i> Ship(T)	4.28	2.32	-
Xanthomonadales (γ-proteobacteria)	<i>Dokdonella koreensis</i> DS-123(T)*	1.41	3.09	-
Flavobacteriales (Bacteroidetes)	<i>Flavobacterium limicola</i> ST-82(T)*	4.28	-	-
Sphingobacteriales (Bacteroidetes)	<i>Terrimonas ferruginea</i> DSM30193(T)*	10.02	3.29	-
	<i>Terrimonas lutea</i> DY(T)*	4.28	1.93	-

\* Conventional denitrifiers

### 5.3. 제한인자와 탈질 우점균의 상관관계 분석

#### 5.3.1. 온도와 탈질 우점균의 상관관계

탈질미생물의 종에 따라 온도 대역별로 우점한 미생물이 존재한다. 탈질 미생물이라 하더라도 온도 대역에 따라 우점하는 미생물과 사멸하는 미생물이 있다. 이를 분석해 Table 5-6과 Fig. 5-7에 나타내었다. 실험단계 I에서 미생물 유전자분석을 위해 시료를 채취한 온도구간은 11.8~15℃였고 실험단계 II는 20.5~27.8℃였고 실험단계 III은 25.9℃였다. 실험단계 I, II는 각각 12℃ 대역과 20~25℃ 대역으로 구분할 수 있겠다.

먼저 일반 탈질미생물(Denitrifiers)과 Methylophilales를 대상으로 저온 영역 실험단계 I (<15℃)에는 우점하다가 실험단계 II, III 영역에서 존재하지 않는 탈질 미생물은 Flavobacteriales 4.28%, Methylophilales 5%, Methylophilales인 *Methylobacillus glycogenes*, *Methylostenobacillus versatilis*가 있었다.

또 12℃인 실험단계 I에는 존재하지 않았으나 20~25℃인 실험단계 II에서 우점하는 종으로 발견된 Hyphomicrobiaceae에 속하는 *Hyphomicrobium facile* subsp. *Facile*은 32%의 우점도를 나타내었다. 25.9℃이면서 유산소 조건이지만 약 12%의 탈질을 진행하고 있는 상태였다. Hyphomicrobiaceae는 실험단계 II에서 32%였던 우점도가 급격하게 줄었지만 8% 우점도로 존재하고 있었다.

Table 5–6. Relative abundance of denitrifiers and Methylophilales on temperature in each phase

Order level (Phylum)	Species & Strain Name(OTU)	(unit : %)		
		phase	phase	phase
		I	II	III
		Temperature (°C)		
		11.8~ 15.0	20.5~ 27.8	25.9
Hyphomicrobiaceae (α-proteobacteria)	<i>Hyphomicrobium facile</i> subsp. <i>Facile</i> IFAMH-526(T)*	-	32.02	8.30
Methylophilales (β-proteobacteria)	<i>Methyлотenera versatilis</i> 301(T)	5.74	-	-
	<i>Methylobacillus glycogenes</i> DSM5685(T)	1.41	-	-
Flavobacteriales (Bacterioidetes)	<i>Flavobacterium limicola</i> ST-82(T)*	4.28	-	-

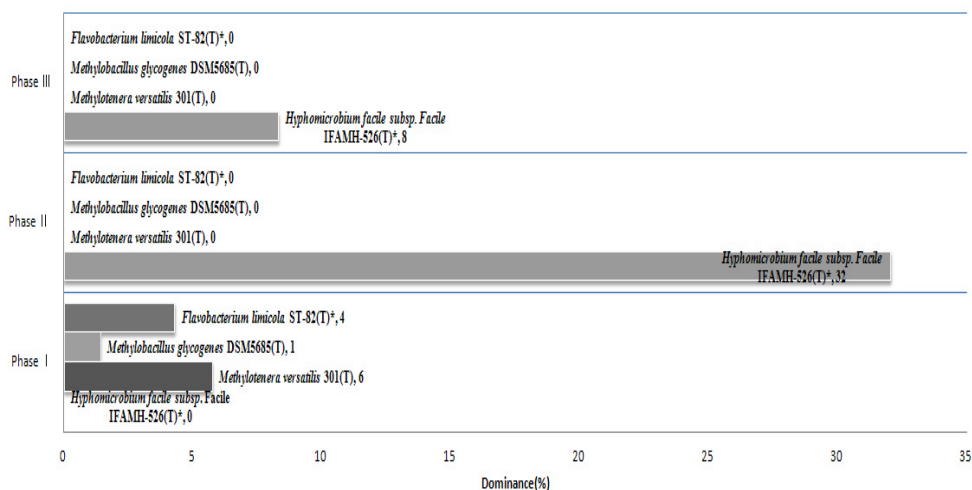


Fig. 5–7. Denitrifiers and Methylophilales to be or not on temperature in each phase

온도조건에 민감하지 않은 탈질미생물은 *Curvibacter delicatus* LMG4328(T), *Dokdonella koreensis* DS-123(T), *Terrimonas ferruginea* DSM30193(T), *Terrimonas lutea* DY(T)와 *Methylothenera mobilis*, *Methylophilus flavus* 였다.

15℃ 이하에서만 우점하는 탈질 미생물은 Methylophilales 7.15%로 *Methylobacillus glycogenes*와 *Methylothenera versatilis*로 구성되어 있었으며 Flavobacteriales는 4.28%였다. 또한 온도 12℃에서 발견된 저온탈질미생물인 Flavobacteriales는 4.28% 우점을 보이고 있는데 제한인자와 Methylophilales를 포함한 탈질미생물간 상호작용에 대한 정량적인 연구가 진행된다면 가장 문제가 되고 있는 탈질의 문제점인 저온에서 탈질효율이 급격하게 저하되는 문제를 해결할 수도 있으리라 생각된다.

20℃ 이상에서는  $\alpha$ -proteobacteria인 Hyphomicrobiaceae가 우점종이었다.

### 5.3.2. 용존산소와 탈질 우점균의 상관관계

메탄올을 주입하기 전 유입수의 용존산소는 각각 1.4~3.6 mg/L, 0.8~1.9 mg/L 그리고 6.0~8.0 mg/L(평균 5mg/L)였다. 탈질미생물이 우점한 상태에서 유입수의 용존산소를 분석해 보면 반응기내의 상태가 탈질미생물에 적합한 산소환경을 제공하고 있는 지 여부를 간접적으로 알 수 있다.

실험단계 I 과 실험단계 II의 용존산소 상태는 최소한 탈질미생물이 활성을 띄고 있기 때문에 무산소 상태와 0.5~0.09mg/L인 미세산소

상태가 공존하고 있음을 알 수 있다.

따라서 실험단계 I, II에는 존재했으나, 실험단계 III에서는 존재하지 않거나, 실험단계 I, II에는 존재하지 않았으나 실험단계 III에서 존재한 탈질미생물과 Methylophilales 종을 나타내었다(Table 5-7).

종별로 보면 *Dokdonella koreensis*, *Terrimonas ferruginea*, *errimonas lutea*는 실험단계 I, II에서 우점하였고 용존산소가 유입된 실험단계 III에서는 발견되지 않았다(Fig. 5-8).

Table 5-7. Relative abundance of denitrifiers and Methylophilales on influent DO in each phase

		(unit : %)		
Order level (Phylum)	Species & Strain Name(OTU)	phase I	phase II	phase III
		Influent DO(mg/L)		
		1.4~ 3.6	0.8~ 1.9	6.0~ 8.0
Methylophilales (β-proteobacteria)	<i>Methylostenella mobilis</i> JLW8(T)	22.89	9.48	-
	<i>Methylophilus flavus</i> Ship(T)	4.28	2.32	-
Xanthomonadales (γ-proteobacteria)	<i>Dokdonella koreensis</i> DS-123(T)*	1.41	3.09	-
Sphingobacteriales (Bacteroidetes)	<i>Terrimonas ferruginea</i> DSM30193(T)*	10.02	3.29	-
	<i>Terrimonas lutea</i> DY(T)*	4.28	1.93	-
Nitrospirales (Nitrospirae and Deinococcus-Ther mus)	<i>Nitrospira defluvii</i>	-	-	16.70

\* Conventional denitrifiers

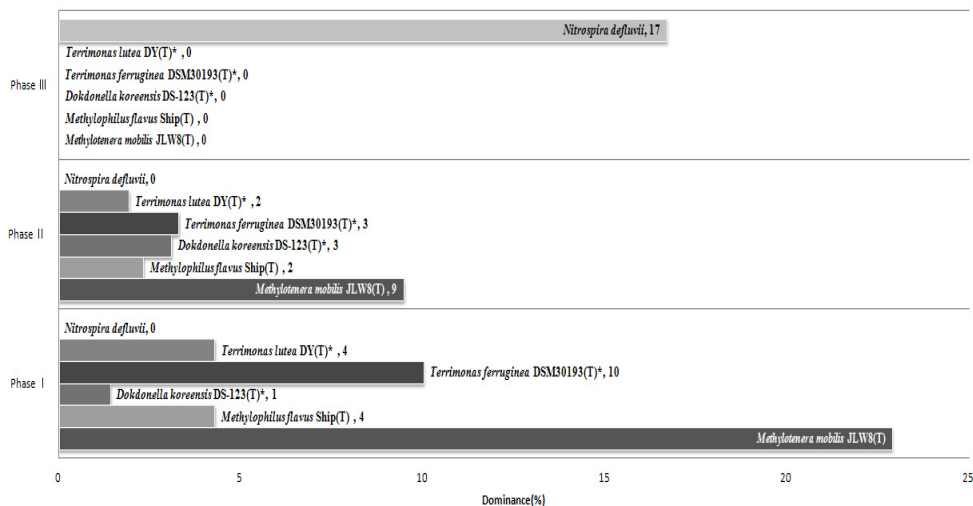


Fig. 5-8. Denitrifiers and Methylophilales to be or not on influent DO in each phase

기타 실험단계 III에서는 용존산소가 공급되어  $\text{NO}_3^-$ -N 제거율이 12%였다. 탈질이 거의 일어나지 않았지만 탈질미생물의 상대적 우점도가 41.60%에 이르는 것(Table 5-5)은 일반적인 탈질미생물이 임의 성인데다가 용존산소가 공급된 후, 시료채취까지 짧은 시간이 경과되어 아직 탈질미생물이 상당수 생존하고 있었으리라 생각된다. 또한 Nitrospirae와 Deinococcus-Thermus 문(Phylum)이 발견되었는데 이 미생물은 탈질기능이 없다. 이 미생물은 호기 조건에서  $\text{NO}_2^-$ 를 산화하는 기능을 가지는 미생물(Spieck et al., 2006)이다.

정리하면 메탈을 주입전 유입수의 용존산소가 0.8~3.6 mg/L에서 종별로 보면 *Dokdonella koreensis*, *Terrimonas ferruginea*, *errimonas lutea*와 *Methylostenora mobilis*, *Methylophilus flavus*가 우점종이었다.



산소의 침투와 전자공여체로 메탄올을 주입한 탈질반응기에서 16s rRNA분석을 통해 *Methylothermobacter* sp.와 일반적인 탈질미생물이 서로 공존하면서 각각의 니치(distinguishable niche)를 형성하고 있었다.

실험단계 I 보다 실험단계 II에서 *Methylophilales*의 상대적 우점도가 27.17%에서 11.8%로 줄어드는 것은 유입 용존산소가 1.4~3.6 mg/L에서 0.8~1.9mg/L로 줄어드는 데서 원인을 찾을 수 있다. 또한 실험단계 III에서는 실험단계 I, II와는 달리 존재하지 않았다. 따라서 *Methylothermobacter* sp.는 미세산소환경(Micro-aerobic condition)하에서  $\text{NO}_3^-$  환원기능,  $\text{N}_2\text{O}$ 를 만드는 불완전한 탈질기능을 가지고 있는 반면 실험단계 III과 같이 용존산소가 과잉으로 존재하거나 실험단계 II을 넘어서 혐기상태로 진행되면 기능을 하지 않는 것으로 본다.

*Methylothermobacter versatilis*와 *Methylothermobacter mobilis*는 탈질반응조에서 가장 우점하거나 상당 정도로 우점하였고 이때의 탈질효율이 평균 0.8161g  $\text{NO}_3^-$ -N/g VS · d로 *Methylothermobacter* sp.가 존재하지 않는 실험단계 III의 0.1358 g  $\text{NO}_3^-$ -N/g VS · d에 비해 월등하게 높았다.

이는 유입수에 메탄올을 주입함에 있어, 유량 균등조에 주입하여 반응기 전단에서 혼합하고 반응기로 들어올 때는 완전 혼합된 상태를 만든 것이 *Methylothermobacter versatilis*, *Methylothermobacter mobilis*, *Methylobacillus glycogenes* 그리고 *Methylophilus flavus*가 활성을 띄는 미세호기조건을 만든 것이다.

생물반응의 첫 단계는 대부분 효소의 율속단계(rate controlling step)인데 *Methylothermobacter* sp.가  $\text{NO}_3^-$ 를 탈질의 중간 반응체인  $\text{N}_2\text{O}$ 까지 빠르게 전환시키고 다른 탈질 미생물들이  $\text{N}_2$ 로 전환한다면 율속단계

를 매우 빠르게 극복할 수 있다. 불완전한 탈질기능을 하지만 메탄을 투여에 따른 탈질 기능 향상에 핵심적인 역할을 하고 있는 것이다.

이에 기반하여 세울 수 있는 가설은 메탄을 주입에 의해 *Methylothermobacter* sp.가 N<sub>2</sub>O를 효율적으로 생산하고, 이것은 전체적인 탈질 반응에서 활성화에너지(Activation Energy)를 낮추는 기능을 하게 될 것이고, 결과적으로 전체적인 탈질 반응이 일어나는 반응속도를 증가시켜주는 역할을 하게 될 것이다. 이들 *Methylothermobacter* sp.에 의한 탈질은 현재까지 관심에서 벗어나 있었다.

## 5.4. 결론

탈질미생물은 아질산성질소 환원(NiR, nitrite reductase), 산화질소 환원(NOR, nitric oxide reductase) 그리고 아산화질소 환원(N2OR, nitrous oxide reductase) 등에 관여하여 온전한 탈질과정에 참여한다.

본 연구에서 발견한 탈질 미생물은  $\alpha$ -proteobacteria내에서는 Hyphomicrobiaceae인 *Hyphomicrobium facile* subsp. *Facile* IFA MH-526(T),  $\beta$ -proteobacteria내에서는 Burkholderiales인 *Curvibacter delicatus* LMG4328(T), *Acidovorax defluvii* BSB411(T), Methylophilales인 *Methylothermobacter versatilis* 301(T), *Methylothermobacter mobilis* JLW8(Tv), *Methylobacillus glycogenes* DSM5685(T), *Methylophilus flavus* Ship(T),  $\gamma$ -proteobacteria내에서는 Xanthomonadales인 *Dokdonella koreensis* DS-123(T), Bacteroidetes내에서는 Flavobacteriales인 *Flavobacterium limicola* ST-82(T), Sphingobacter

iales(Bacterioidetes) *Terrimonas ferruginea* DSM30193(T), *Terrimonas lutea* DY(T) 등이 탈질미생물로 분류되었다.

메탈올 주입전 유입수의 용존산소가 0.8~3.6 mg/L에서 종별로 보면 *Dokdonella koreensis*, *Terrimonas ferruginea*, *errimonas lutea*와 *Methylothenera mobilis*, *Methylophilus flavus*가 우점종이었다.

온도조건에 민감하지 않은 탈질미생물은 *Curvibacter delicatus* LMG4328(T), *Dokdonella koreensis* DS-123(T), *Terrimonas ferruginea* DSM30193(T), *Terrimonas lutea* DY(T)와 *Methylothenera mobilis*, *Methylophilus flavus*였다.

15℃ 이하에서만 우점하는 탈질 미생물은 Methylophilales 7.15%로 *Methylobacillus glycogenes*, *Methylothenera versatilis*로 구성되어 있었고 Flavobacteriales는 4.28%였다. 20℃ 이상에서만 탈질을 하는 종은 *Hyphomicrobium facile* subsp. *Facile*이며 이 종은 용존산소조건에도 민감하지 않은 종이었다.

용존산소 및 온도와 관련하여 현재까지 관심에서 벗어나 있었지만 주목하여야 할 종으로는 *Methylothenera versatilis*와 *Methylothenera mobilis*가 있었다. 이들은 탈질 반응조에서 온도에 관계 없이 미세산소상태에서 우점하거나 상당 정도로 우점하였고 이때의 탈질 효율이 평균 0.8161g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/g VS · d로 *Methylothenera sp.*가 존재하지 않는 실험단계 III의 0.1358 g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/g VS · d에 비해 월등하게 높았다.

자세히 보면 *Methylothenera sp.*는 실험단계 I의 용존산소 2.50±1.10 mg/L에서 27.17%의 우점을 보였고, 실험단계 II의 용존산소 1.35±0.55 mg/L에서 11.8%의 우점을 보인 것으로 보아 유입수 용

존산소 농도와 우점도가 비례함을 알 수 있다. 따라서 미세산소조건에서 질산성질소를 분해하여 온난화 물질인  $N_2O$ 를 생산하는 *Methylobacter* sp.만을 대상으로 용존산소와 탈질효율 그리고  $N_2O$  발생량에 대한 정량적인 연구가 필요하며 군집상태에서  $N_2O$ 가 다른 미생물에 의해 처리되는 지,  $N_2O$ 가 그대로 대기 중에 방출되는 지에 대한 연구도 필요할 것으로 사료된다.

만약 *Methylobacter* sp.가  $NO_3^-$ 를 탈질의 중간 반응체인  $N_2O$ 까지 빠르게 전환시키고 다른 탈질 미생물들이  $N_2O$ 로 전환한다면 율속단계를 매우 빠르게 극복해 주는 역할을 하는 것이고, 그렇지 않다면 온난화물질을 배출하는 미생물일 것이다.

## 6. 결 론

본 연구는 기존의 탈질효율을 연구하였던 공학적인 분석에 미생물 자체에 대해 연구하는 분자생물학적인 분석을 도입하여 탈질 제한요인과 탈질효율을 탈질미생물 종과 연계하여 해석하고자 하였다. 이는 환경공정의 효율을 높이하고자 하는 의도뿐 아니라 궁극적으로는 오염물질 처리자인 탈질미생물을 오염물질처리 환경과 용도에 따라 선택적이고 효율적으로 활용할 수 있는 출발점이기도 하다.

첫째, 본 연구에서 사용한 상향류식 유동상 반응기는 하수처리장에서 실규모로 운전하였기 때문에 온도를 임의로 조정할 수는 없는 상태였고 실제로 하수처리장에서 상향류식 유동상반응기 운영시 설치조건이기도 하다. 상향류식 유동상반응기에서 온도와 탈질효율간의 상관관계를 Arrhenius식으로 제시하면  $r_{D(t)} = r_{D(20)} \times 1.1651^{T-20} + 0.02$ 였다.  $r_{D(t)}$ 는 탈질효율( $\text{g NO}_3^- - \text{N/g VSS} \cdot \text{d}$ ),  $r_{D(20)}$ 는  $20^\circ\text{C}$ 에서 탈질효율,  $\theta$ 는 경험적 온도상수,  $T$ 는 온도( $^\circ\text{C}$ )이고 상향류식 유동상반응기에서 경험적 온도상수  $\theta$ 는 1.165였다.

$r_{D(20)}$ 를 본 연구의 결과값인  $1.12 \text{ NO}_3^- - \text{N/g VSS-d}$ 로 하고 비교했을 때,  $\theta$  값은 US EPA의 1.029(US EPA, 2010a)보다는 높았지만 다른 연구결과인 1.09~1.24의 사이에 있어 일반적인 탈질공정과 비교하면 중간 정도의 민감도를 나타내었다(Fig. 4-6).

또한  $15^\circ\text{C}$  이하일 때는 탈질효율이 평균  $0.39 \text{ NO}_3^- - \text{N/g VSS-d}$ ,  $20^\circ\text{C}$ 일 때는  $1.12 \text{ NO}_3^- - \text{N/g VSS-d}$ 였으므로 오염물질 유입량이 같다고 가정하면 동절기의 수리학적 체류시간을 약 2.9배 이상으

로 연장하여 운전하여야 함을 알 수 있었다.

둘째, 메탄올 주입량과 탈질효율간의 상관관계인 C/N비를 분석한 결과 최적의 주입량은 C/N비로 4.65( $\text{COD}_{\text{dosed}}/\text{NO}_3^- - \text{N}_{\text{removed}}$ )였다. 여타의 탈질공정의 최적주입량이 4.5~5.0( $\text{COD}_{\text{dosed}}/\text{NO}_3^- - \text{N}_{\text{removed}}$ )임을 감안하면 상향류식 유동상반응기가 상대적으로 작은 양의 메탄올을 주입하여도 된다는 것을 알 수 있었다.

셋째, 이전의 연구들에 의하면 반응기내에서 용존산소농도는 0.09~1 mg/L여야 한다(Table 2-4). 본 연구에서는 전처리 설비를 두지 않고도 효율적으로 운전할 수 있는 메탄올 주입 전 용존산소 상한은 1.9mg/L로 관리하여야 함을 알 수 있었다.

마지막으로 복잡한 탈질 메커니즘에서 운전조건에 따라 메탄올 이용 탈질 우점 미생물 군집 내에 존재하는 각각의 종이 어떻게 변화하는지를 파악하고, 분류하였다.

먼저 탈질 시 용존산소의 상태를 판단함에 있어 *Dokdonella koreensis*, *Terrimonas ferruginea*, *errimonas lutea*는 무산소 상태(Anaerobic condition)에 대한 지표 미생물임을 알 수 있었다. 또한 *Methylothermobacter mobilis*와 *Methylophilus flavus*는 일반적인 탈질 균들과는 달리 미세산소상태(micro-aerobic condition)에서 탈질 미생물 종임을 확인하였다.

미생물의 우점상태를 근거로 반응기 내부의 용존산소 상태를 판단해 보면 미세산소상태와 무산소상태가 공존하고 있다. 이는 생물막이 두꺼워지면 내부에 혐기상태가 생성되는 결과일 수도 있으나, 상향류식 유동상반응기는 여재의 순환으로 인하여 얇은 생물막이 계속 유지되기 때문에 물의 흐름을 Plug flow로 가정하면 반응기의 높이가 중요한 원인이다. 따라서 상향류식 유동상반응기에서는 여재층의 높이가 중요하며

본 연구에서는 2m를 적용하여 질산성질소 부하가 33 mg/L까지는 처리하는 데 문제가 없음을 확인하였다. 이후 연구에서는 유입 오염물질 부하량 별로 여재 높이와 탈질효율 간 관계를 분석할 필요가 있을 것으로 사료된다.

마지막으로 온도와 관련한 결과를 보면, 온도조건에 민감하지 않은 탈질미생물은 *Curvibacter delicatus* LMG4328(T), *Dokdonella koreensis* DS-123(T), *Terrimonas ferruginea* DSM30193(T), *Terrimonas lutea* DY(T)와 *Methylostenobacillus mobilis*, *Methylophilus flavus* 였다.

15℃ 이하에서만 우점하는 탈질 미생물은 Flavobacteriales, Methylophilales에 속하는 *Methylobacillus glycogenes*, *Methylostenobacillus versatilis*였고 20℃ 이상에서만 탈질활동을 하는 종은 *Hyphomicrobium facile* subsp. *Facile*이며 이 종은 용존산소조건에도 민감하지 않은 종이었다. 따라서 탈질 시 온도 제약조건을 극복하기 위해서는 저온 탈질미생물인 Flavobacteriales에 대한 집중적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

종합적으로 분석해 보면 용존산소 및 온도와 관련하여 현재까지 관심에서 벗어나 있었지만 주목하여야 할 종으로는 *Methylostenobacillus versatilis*와 *Methylostenobacillus mobilis*가 있었다. 이들은 탈질 반응조에서 온도에 관계없이 미세산소상태에서 우점하거나 상당 정도로 우점하였고 이때의 탈질효율이 평균 0.8161g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/g VS · d로 *Methylostenobacillus sp.*가 존재하지 않는 실험단계 III의 0.1358 g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/g VS · d에 비해 월등하게 높았다.

*Methylostenobacillus sp.*는 실험단계 I의 2.50±1.10 mg/L 용존산소 조건에서 27.17% 우점을 보이고 실험단계 II의 1.35±0.55 mg/L 용존

산소 조건에서 11.8% 우점을 보이고 있어 유입수 용존산소 농도와 우점도가 비례함을 알 수 있다. 따라서 미세산소 조건에서 질산성질소를 분해하여 온난화 물질인  $N_2O$ 를 생산하는 *Methylothermobacter* sp.만을 대상으로 용존산소와 탈질효율 그리고  $N_2O$  발생량에 대한 정량적인 연구가 필요하며 군집상태에서  $N_2O$ 가 다른 미생물에 의해 처리되는 지,  $N_2O$ 가 그대로 대기 중에 방출되는 지에 대한 연구도 필요할 것으로 사료된다.

만약 *Methylothermobacter* sp.가  $NO_3^-$ 를 탈질의 중간 반응체인  $N_2O$ 까지 빠르게 전환시키고 공생하는 다른 탈질 미생물들이  $N_2$ 로 전환한다면 율속단계를 매우 빠르게 극복해 주는 역할을 하는 것이고, 그렇지 않다면 온난화물질을 배출하기 때문에 제어해야 할 미생물이 될 것이다.



## 참 고 문 헌

녹색환경기술, 연세대학교, 2005, "고농도 산업폐수의 질소저감을 위한 물리화학적 고도처리기술 개발에 관한 연구", 환경부, pp.31-78

김동진, 김현기, 김유리, 2011, "탈질에서 질소성분 및 유기탄소 농도가  $N_2O$  배출에 미치는 영향", Clean Technology, Vol. 17(2), pp.134-141.

김인수, 광주과학기술원, 2001, "C/N비가 낮은 폐수의 질소·인 제거를 위한 황 이용 탈질공법(SPAD 공법) 적용 및 모니터링 기법개발", 환경부, p.6.

박준범, 2004, "Tidal Process를 이용한 소규모 하수처리의 효율제고를 위한 연구", 석사논문, 영남대학교 대학원, p.18.

윤조희와 이상훈, 1999, "A2O 공정을 이용한 고정생물막법에서 C/N비 변화에 따른 유기물과 질소제거 특성", J. KSEE, Vol. 21(6), pp.1037-1045.

임점호와 최우진, 2006, "외부탄소원별 전처리 방법에 따른 탈질특성에 관한 비교연구", 대한상하수도학회·한국물환경학회 2006공동 추계학술발표회 논문집, p.74.

하수도법 시행규칙 제3조 제1항 제1호 별표 1, 2012.

Araki N1, Tsukamoto Y, Nagano A, Yamaguchi T, Harada H., 2006, "Real-time PCR quantification of nitrite reductase (nirS) genes in a nitrogen removing fluidized bed reactor", Water Sci Tech. Vol. 53(6), pp.59–65.

Ahmed, A. M. and Ibrahim, A. A., 2012, "An Energy Integration Approach on UHDE Ammonia Process", World Acad. Science, Engi. Tech., Vol. 6, pp.1705–1711

An KG and JR Jones, 2000, "Temporal and spatial patterns in ionic salinity and suspended solids in a reservoir influenced by the Asian monsoon", Hydrobiol., Vol. 436, pp.179–189.

Baytshtok, V., Kim, S., Yu, R., Park, H., Chandran, K., 2008, "Molecular and Biokinetic Characterization of Methylo trophic Denitrification Using Nitrate and Nitrite as Terminal Electron Acceptors", Water Sci and Tech., Vol. 58(2), pp.359–365.

Baytshtok, V., Lu, H., Park, H., Kim, S., Yu, R., Chandran, K., 2009, "Impact of varying electron donors on the molecular microbial ecology and biokinetics of methylo trophic denitrifying bacteria", Biotech. Bioeng., Vol. 102, pp.1527–1536.

Beck DA1, Hendrickson EL, V. A., Wang T., Lim S., Kalyuzhnaya

MG, Lidstrom ME, Hackett M, Chistoserdova L., 2011, "An integrated proteomics/transcriptomics approach points to oxygen as the main electron sink for methanol metabolism in *Methylothermobacter mobilis*", J. Bact., Vol. 193, pp.4758–4765.

Braker, 1998, "Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (nirK and nirS) to detect denitrifying bacteria in environmental samples", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 64(10), pp.3769–3775.

Brito, A.G. and Melo, L.F., 1997, "A simplified analysis of reaction and mass transfer in UASB and EGSB reactors", Environ. Technol., Vol. 18, pp.35–44.

Bruce E. Rittman, Perry L. McCarty, 2002, "생물환경공학: 생물학적 처리와 응용", 번역 배우근, 배재호, 양지원, 한국맥그로힐, 서울, p. 548.

B.S. Moraes, T.S.O. Souza, E. Foresti, 2012, "Effect of sulphide concentration on autotrophic denitrification from nitrate and nitrite in vertical fixed-bed reactors", Proc. Biochem., Vol. 47, pp.1395–1401.

Chen, T., Zheng, P., Tang, C., Wang, S., Ding, S., 2011, "Performance of ANAMMOX-EGSB reactor", Desalination, Vol.

278, pp.281–287.

Cherchi, C., A. O. Haydern, A. Z. Gu., 2008, "Investigation of Microc<sup>TM</sup> as an Alternative Carbon Source for Denitrification", Proceedings WEF 75th ACE. Chicago, IL., p.3154

Chistoserdova, L., 2011, "Methylotrophy in a lake: from metagenomics to single-organisms physiology", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 77, pp.4705–4711.

Dawson, R. N. and Murphy, K. L., 1972, "The Temperature Dependency of Biological Denitrification", Wat. Res., Vol. 6, pp.71.

Dawson, R. N. and Murphy, K. L., 1973, "Factors Affecting Biological Denitrification of Waste Water, in Achances in Water Pollusion Research", ed. by S.H. Jenkins, Pergamon Press, London, P.671.

DeBarbadillo, C., J. Barnard, S. Tarallo, M. Steichen., 2008, "Got Carbon? Widespread Biological Nutrient Removal is Increasing the Demand for Supplemental Sources", Water Envi. Tech., Alexandria, VA: WEF, Vol. 20(1), pp.49–53.

Ding L1 and Yokota A., 2004, "Proposals of Curvibacter gracilis

gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov.", Int. J. Syst. Evol. Microbiol., Vol. 54(6), pp.2223–2230.

Dold P, Takacs I, Mokhayeri Y, Nichols A, Hinojosa J, Riffat R, Bott C, Bailey W, Murthy S. 2008, "Denitrification with carbon addition kinetic considerations", Water Environ. Res., Vol. 80(5), pp.417–427.

G. Farabegoli, R. Gavasci, F. Lombardi., 2007, "Denitrification in Tertiary Filtration: Application of an Up–Flow Filter", J. Environ. Sci. Heal., Part A, Vol. A38(10), pp.2169–2177.

Ginige, M. P., Hungenhotz, P., Daims, H., Wagner, M., Keller, J., Blackall, L.L., 2004, "Use of stable–isotope probing, full–cycle rRNA analysis, and fluorescence *in situ* hybridization–microautography to study a methanol–fed denitrifying microbial community", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 70, pp.588–596.

Glockner, A. B., Jungst, W. G. Zumft, 1993,

"Copper-containing nitrite reductase from *Pseudomonas aureofaciens* is functional in a mutationally cytochrome *cd1*-free background(*NirS*<sup>-</sup>) of *Pseudomonas stutzeri*", Arch. Microbiol., Vol. 160, pp.18–26.

Hallin, S. and M.Pell., 1998, "Metabolic Properties of Denitrifying Bacteria Adapting to Methanol and Ethanol in Activated Sludge", Water Res., Vol. 32(1), pp.13–18.

Hylemon, 1973, "The genus *Spirillum*: a taxonomic study", Int. J. Syst. Evol. Microbiol., Vol. 23(4), pp.340–380.

Tamaki H1, Hanada S, Kamagata Y, Nakamura K, Nomura N, Nakano K, Matsumura M., 2003, "*Flavobacterium limicola* sp. nov., a psychrophilic, organic-polymer-degrading bacterium isolated from freshwater sediments", Int. J. Syst. Evol. Microbiol., Vol. 53(Pt 2), pp.519–526.

IWA, 2006, "Advanced biological Treatment Processes for Industrial Wastewaters edited; Principles of process design for industrial wastewater treatment systems", Chapter 3.

J. Gijs Kuenen, 2008, "Anammox bacteria: from discovery to application", Nature Rev. Microbiol., Vol. 6, pp.320–326

Jennifer, J. J., Alexandra, L. H., Tahseen, I. A. S., Richard, E. G., James, V. T., 2001, "Loss of the short arm of the Y chromosome in human prostate carcinoma", *Cancer Gen. Cytogen.*, Vol. 124(2), pp.122–126.

Jeong, J., Hidaka, T., Tsuno, H., Oda, T., 2006, "Development of biological filter as tertiary treatment for effective nitrogen removal: Biological filter for tertiary treatment", *Water Res.*, Vol. 40, pp.1127–1136.

Kalyuzhnaya, 2006, "*Methylothermobacter mobilis* gen. nov., sp. nov., an obligately methylamine-utilizing bacterium within the family Methylophilaceae", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Vol. 56(12), pp.2819–2823.

Kalyuzhnaya, M.G., Lapidus, A., Ivanova, N., Copeland, A.C., McHardy, A.C., Szeto, E., Salamov, A., Grigoriev, I.V., Suci, D., Levine, S.R., Markowitz, V.M., Routh, I., Tringe, S.G., Bruce, D.C., Richardson, P.M., Lidstrom, M.E., Chistoserdova, L., 2008, "High-resolution metagenomics targets specific functional types in complex microbial communities", *Nature Biotech.*, Vol. 26, pp.1029–1034.

Kalyuzhnaya, 2009, "Methylophilaceae link methanol oxidation to denitrification in freshwater lake sediment as suggested by stable

isotope probing and pure culture analysis", *Envi. Microbiol. Rep.*, Vol. 1(5), pp.385–392.

Kalyuzhnaya, 2012, "Novel methylotrophic isolates from Lake Washington sediment and description of a new species in the genus *Methylothera*, *Methylothera versatilis* sp. nov.", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Vol. 63(4), pp.106–111.

Karen Alexandra Bill, 2009, "Evaluation of alternative electron donors for denitrifying moving bed biofilm reactors(MBBRs)", the degree of Master of Science, Virginia Polytechnic Institute and State of University, p.11.

Kumaraswamy, R., K. Sjollem, G. Kuenen, M. C. M. van Loosdrecht, G. Muyzer, 2006, "Nitrate. Dependent [Fe(II)EDTA] (2.) Oxidation by *Paracoccus ferrooxidans* sp nov., Isolated From A Denitrifying Bioreactor", *Syst. Appl. Microbiol.*, Vol. 29(4), pp.276–286.

Lapidus, 2011, Genomes of three methylotrophs from a single niche reveal the genetic and metabolic divergence of the methylophilaceae, *J. Bacteriol.*, Vol. 93(15), pp.3757–3764.

Lettinga, G., Hulshoff Pol, L.W., 1991, "UASB–process design for various types of wastewaters", *Water Sci. Technol.*, Vol. 24,



pp.87–107.

Littleton, H. X., G. T. Daigger, P. F. Strom, R. A. Cowan, 2003, "Simultaneous Biological Nutrient Removal: Evaluation of Autotrophic Denitrification, Heterotrophic Nitrification, and Biological Phosphorus Removal", *Water Environ. Res.*, Vol. 75, pp.138–150.

Manning, J.F., Irvin, R.L., 1985, "The biological removal of phosphorus in a sequencing batch reactor". *J. Wat. Pollut. Control. Fed.*, Vol. 57, pp.87–94.

McCarty, P. L., L. Beck, P. St. 1969, "Amant, Biological Denitrification of Wastewaters by Addition Of Organic Materials", *Proc. 24th Annual Purdue Industrial Waste Conf.*, p.1271.

Mulder, A., A.A. Graaf, L.A. Robertson, J.G. Kuenen., 1995, "Anaerobic Ammonium Oxidation Discovered in a Denitrifying Fluidized Bed Reactor", *FEMS Microbiol. Ecol.*, Vol. 16(3), pp.177–184.

Mustakhimov, 2013, "Denitrification in *Methylothermobacter mobilis*: a mutant perspective", *J. Bact.*, Vol. doi: 10.1128/JB.00069–13 (Accepted Manuscript).

Nelson L. M., Knowles, R., 1978, "Effect of Oxygen and Nitrate on Nitrogen Fixation and Denitrification by *Azospirillum Brasilense* Growth in Continuous Culture", Can. J. Microbiol., Vol. 24, p.1395.

Nicolella, C., Van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., 2000, "Wastewater treatment with particulate biofilm reactors", J. Biotech., Vol. 80, pp.1–33.

Nichols, A., J. Hinojosa, R. Riffat, P. Dold, I. Takacs, C. Bott, W. Bailey, S. Murthy, 2007, "Maximum Methanol utilizer Growth Rate Impact of Temperature on Denitrification", Proceedings of WEF 74th ACE. San Diego, CA.

Oh, J., Silverstein, J., 1999, "Oxygen inhibition of activated sludge denitrification", Water Res. Vol. 33, pp.1925–1937.

Osaka, 2006, "Identification of acetate or methanol assimilating bacteria under nitrate reducing conditions by stable–isotope probing", Micro. Ecol., Vol. 52(2), pp.253–266.

Rainey, 1998, "Phylogenetic analysis and intragenetic structure of the genus *Hyphomicrobium* and the related genus *Filomicrobium*", Int. J. Syst. Evol. Microbio., Vol. 48(3), pp.635–639.

Schauer, 2005, "Diversity and phylogenetic affiliations of morphologically conspicuous large filamentous bacteria occurring in the pelagic zones of a broad spectrum of freshwater habitats", *Appl. Environ. Microbio.*, Vol. 71(4), pp.1931–1940.

Schmidt, I., O. Sliekers, M. Schmid, E. Bock, J. Fuerst, J. G. Kuenen, M. S. M. Jetten, M. Strous, 2003, "New Concepts Of Microbial Treatment Processes for the Nitrogen Removal in Wastewater", *FEMS Microbio. Rev.*, Vol. 27, pp.481–492.

Schramm. A., 2003, "In Situ Analysis of Structure and Activity of the Nitrifying Community in Biofilms, Aggregates and Sediments", *Geomicrobiol. J.*, Vol. 20, pp.313–333.

Spieck, 2006, "Selective enrichment and molecular characterization of a previously nuncultured *Nitrospira*–like bacterium from activated sludge", *Environ. Microbio.*, Vol. 8(3), pp.405–415.

Strohmeier, A., Schroeter, I., 1993, "In Experience and Biological Filtration in Advanced Wastewater Treatment", *Proceedings of the European Water Filtration Congress, Oostende, Belgium*, Vol. 17.

T. Dalsgaard, Thamdrup, Bo, Canfield, Donald Eugene, 2005, "Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in the marine environment", Res. Microbio., Vol. 156, pp.457–464.

Tchobanoglous, G., F. L. Burton, H.D. Stensel, 2003, "Wastewater Engineering: Treatment and Reuse", New York, NY: McGraw-Hill.

Thomsen, 2007, "Ecophysiology of abundant denitrifying bacteria inactivated sludge", FEMS Microbio. Ecol., Vol. 60(3), pp.370–382.

Timmermans, P., A. Van Haute, 1983, "Denitrification with Methanol. Fundamental Study of the Growth and Denitrification Capacity of *Hyphomicrobium* sp.", Water Res., Vol. 17, pp.1249–1255.

US EPA, 2009, "Nutrient control design manual: State of technology review report", EPA/600/R-09/012, pp.33–45.

US EPA, 2010a, "Nutrient control design manual: 4. Principles of Biological Nitrogen Removal", EPA/600/R-10/100, pp.1–46.

US EPA, 2010b, "Nutrient control design manual: 6. Overview of Nitrogen and Phosphorus Removal Technologies",

EPA/600/R-10/100, pp.1-46.

Van Verseveld, H. W., A. H. Stouthamer, 1978, "Electron Transport Chain and Coupled Oxidative Phosphorylation in Methanol. Grown *Paracoccus* Denitrifications", *Arch. Microbiol.*, Vol. 118, pp.13-20.

Veraart, A.J., 2011, Warming can boost denitrification disproportionately due to altered oxygen dynamics, *PLoS ONE*, Vol. 6(3), e18508.

Wheatland, A.B., Barnett, M. J., Bruce, A. M., 1959, "Some Observations on Denitrification in Rivers and Estuaries", *Sewage Purif. J. Proc.*, p.149.

Yamada, 2005, "Diversity, localization, and physiological properties of filamentous microbes belonging to *Chloroflexi* subphylum I in mesophilic and thermophilic methanogenic sludge granules", *Appl. Environ. Microbio.*, Vol. 71(11), pp.7493-7503.

Z. Ahmed, S.M. Kim. I.S. Kim. M.S. Bum, K.J. Chae, J.H. Joo, Y. S. Ok, S.E. Oh, 2012, "Nitrification and denitrification using biofilters packed with sulfur and limestone at a pilot-scale municipal wastewater treatment plant", *Environ. Tech.*, Vol. 33, pp.7804-7811.

Zumft, W.G., 1997, "Cell biology and molecular basis of denitrification", *Microbio. Mol. Bio. Rev.*, Vol 61, pp.533–616.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Methylotroph>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Methemoglobinemia>

<http://www.eztaxon.org>

<http://www.megasoftware.net>

<http://www.mothur.org>

## Abstract

# A study on the correlation between control factors and denitrifiers in a full-scale denitrifying upflow fluidized bed reactor (FBR)

Ju Seong Kim

Department of Civil, Urban,  
and Geosystem Engineering

The Graduate School

Seoul National University

Nitrogen and phosphorus are the causative agents for the eutrophication. In addition, an excessive amount of the nitrate ( $\text{NO}_3\text{--N}$ ) in water may form a carcinogen, and that of nitrite in water may be induced with cyanosis.

To prevent phosphorus from entering the river, government focuses in phosphorus in prior to 2012. Sewage treatments have installed tertiary treatment facilities for discharging phosphorous under 0.2 mg/L.

Despite of the installation, it was issued in 2013, too.

To solve this problem of eutrophication, government has tightened the total nitrogen discharge limits to 20 mg/L or less for public wastewater treatment facilities, regardless of the season and the region in 2012. Thus, tertiary treatment processes for nitrogen are needed in public sewage treatment facilities.

The processes for nitrogen removal in wastewater treatment are commonly divided into physicochemical processes and biological treatment processes. The treatment efficiency of physicochemical processes is constant and can treat the wastewater, even if the toxic substances are in. Though the advantages of it are, the cost of electrochemical processes is expensive than the biological treatment operation, because that processes use electrical energy and chemicals, as zinc chloride and aluminum powder, etc. A lot of special knowledge is required in managing the processes, therefore the application of that is limited.

Biological nitrogen removal processes utilizing microorganisms can be divided into the heterotrophic processes and autotrophic processes. The most of sewage treatment plants in Korea have used heterotrophic



denitrification processes. Heterotrophic process is a technology for denitrification which uses facultative microorganisms with injecting an organic carbon source such as methanol, ethanol and others in anaerobic condition, after using microorganisms to oxidize ammonia to nitrate in aerobic condition.

The FBR (Fluidized Bed Reactor) have installed in over 50 sewage treatment plants in Korea, to remove total phosphorus. IF the FBRs already installed can treated T-N, as well as T-P, it would be cost saving.

In this study, the objects were to evaluate the capable of treating the T-N and to determine the optimal operating parameters for operating a FBR. For this, first, the correlation between temperature and SDNR is analyzed. Second, through the correlation analysis between the injection volume of methanol and SDNR, most suitable C/N ratio is obtained. Thirdly, from a practical standpoint, the upper limit of dissolved oxygen in the influent before methanol injection analyzed. Finally, the correlation between the changed condition in DO and T (temperature) and microorganisms was analyzed. And the dominant microorganism was determined in the changed conditions.

A pilot FBR was installed in a sewage treatment

plant.  $\text{COD}_{\text{Mn}}$  were analyzed with the Standard Methods (APHA, AWWA and WPCF, 1995), Flow rate with the on-line Auto Meter Green Flowmeter SSM100 (SSMI, Korea), nitrate ( $\text{NO}_3^-$ -N) with the HACH DR890 (HACH Co, USA) and NITRATAX plus sc (HACH Co, USA, on-line automatic measuring sensor), DO with HACH sc 200TM Universal Controller (HACH Co, USA) and the temperature with the TMS (Telemetry system) data of the sewage treatment plant. In addition, molecular biological technology, 16S rRNA was used for the analysis of microbial community.

An empirical temperature constant  $\theta$  was 1.165. C/N ratio ( $\text{COD}_{\text{dosed}}/\text{NO}_3^-$ -N<sub>removed</sub>) on the basis of the methanol was 4.65. In addition, the upper limit of DO in the influent before methanol injection was 1.9mg/L. When DO and temperature changed, the dominant microbial species were changed. In the cross-correlation analysis, an important discovery of microbes in denitrification was *Flavobacteriales* at low temperature. Another important discovery of microbes in denitrification was *Methylothermobacter* *versatilis* and *Methylothermobacter mobilis* to do incomplete denitrification in micro-aerobic condition.

The significances of this study are summed up with

three conclusions as bellows.

The first, the technology of FBR can be applied to real wastewater treatment plant because FBR was verified at a full-scale on a real sewage plant. This reactor can supply maintenance water for streams through the improvement of effluent water quality in wastewater and sewage water treatment plant.

Second, the FBR already installed in sewage treatment facilities can remove T-N, as well as T-P. It means to increase the utilization of existing systems by extending the treatment target substance.

Third, the changes of denitrification limiting factor (DO and temperature conditions) make the changes of dominant species. The results of the cross-correlation analysis about that can focus the species which needs to be improved or cultured.

Keywords: denitrification limiting factor, Upflow fluidized bed reactor, *Flavobacteriales*, *Methylothermobacter* spp., Micro-aerobic condition

***Student ID : 99411-803***

# Appendix

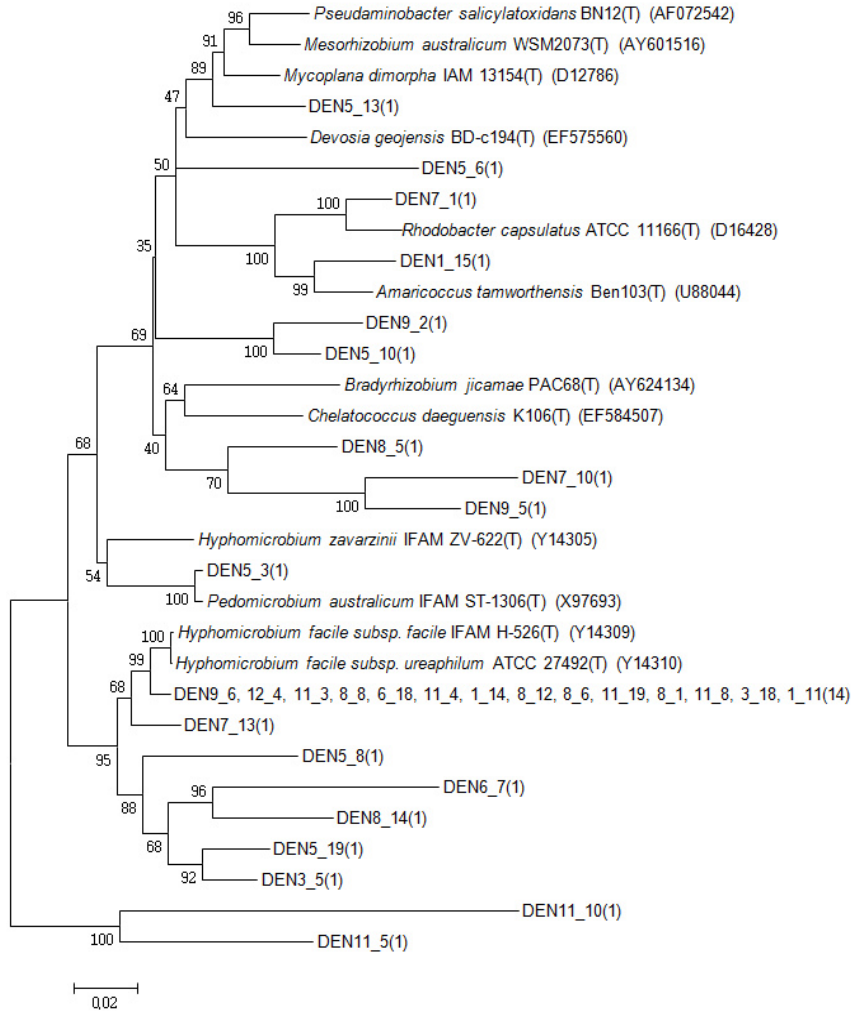


Fig. a-1. Phylogenetic tree of  $\alpha$ -proteobacteria at phase II

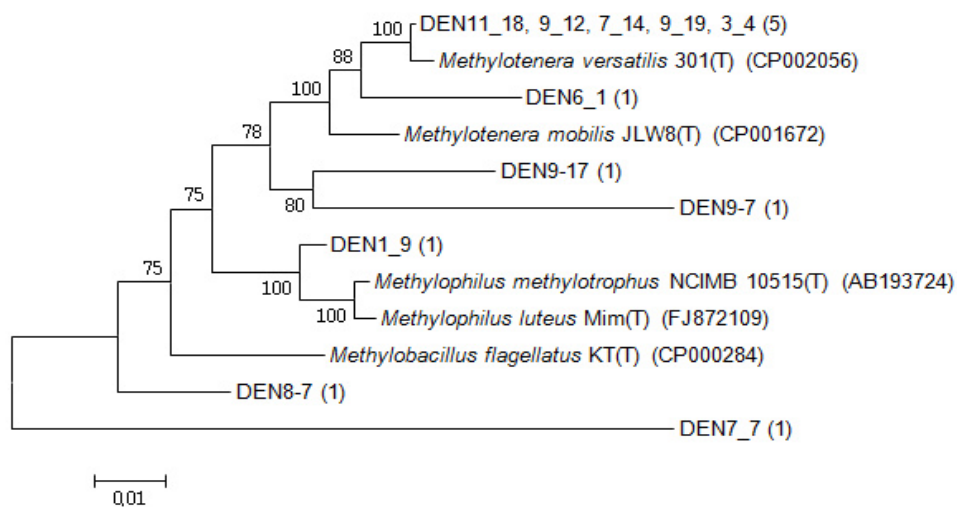


Fig. a-2. Phylogenetic tree of Methylophilales group of  $\beta$ -proteobacteria at phase II

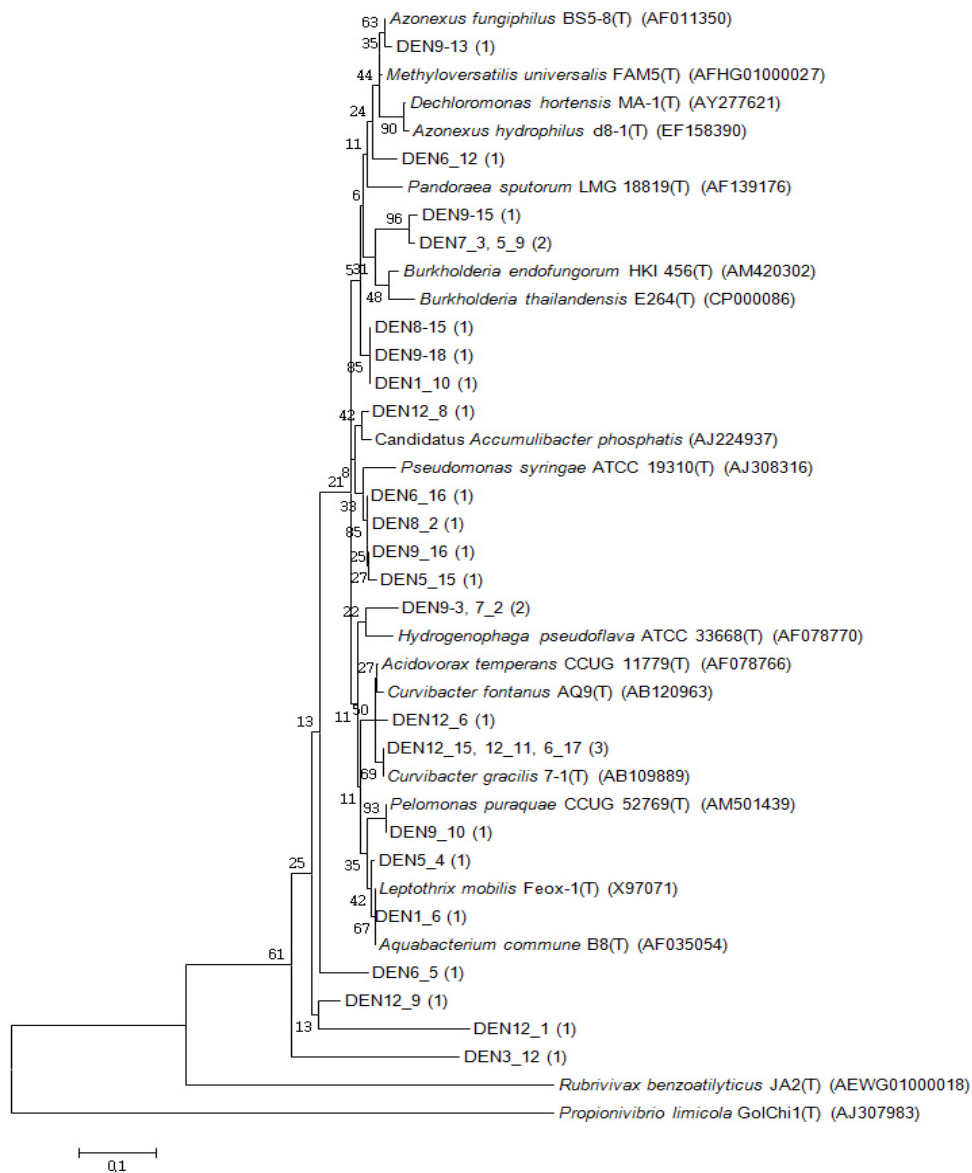


Fig. a-3. Phylogenetic tree of the group without Methylophilales in  $\beta$ -proteobacteria at phase II

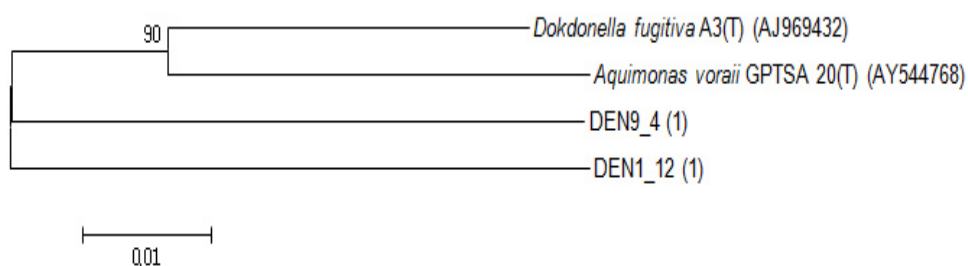


Fig. a-4. phylogenetic tree of  $\gamma$ -proteobacteria at phase II

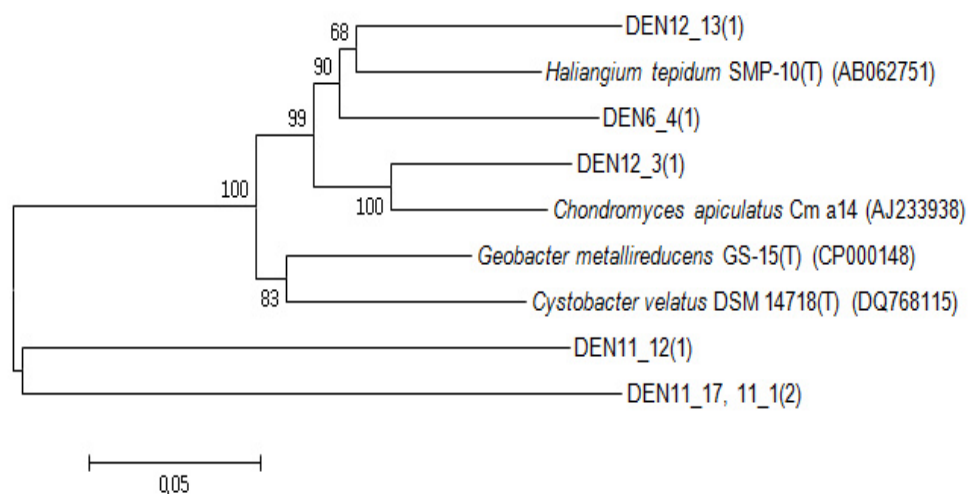


Fig. a-5. Phylogenetic tree of  $\delta$ -proteobacteria at phase II

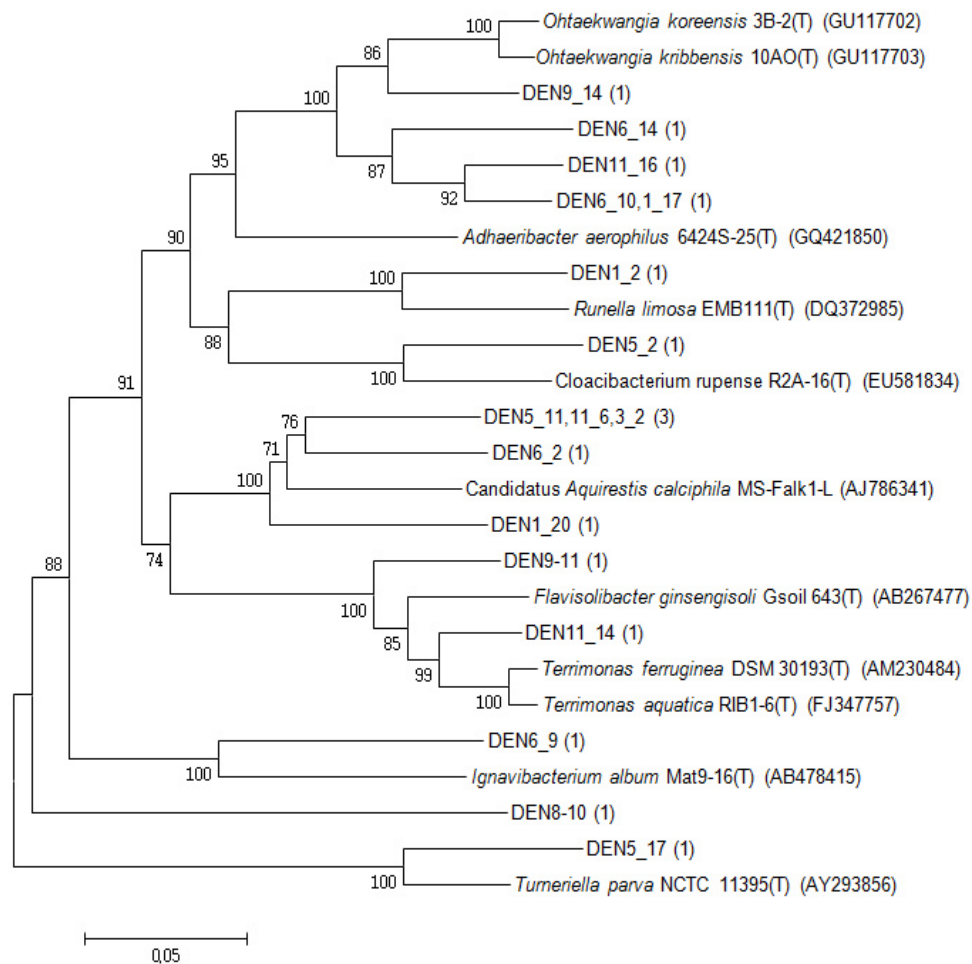


Fig. a-6. Phylogenetic tree of Bacteroidetes phylum at phase II



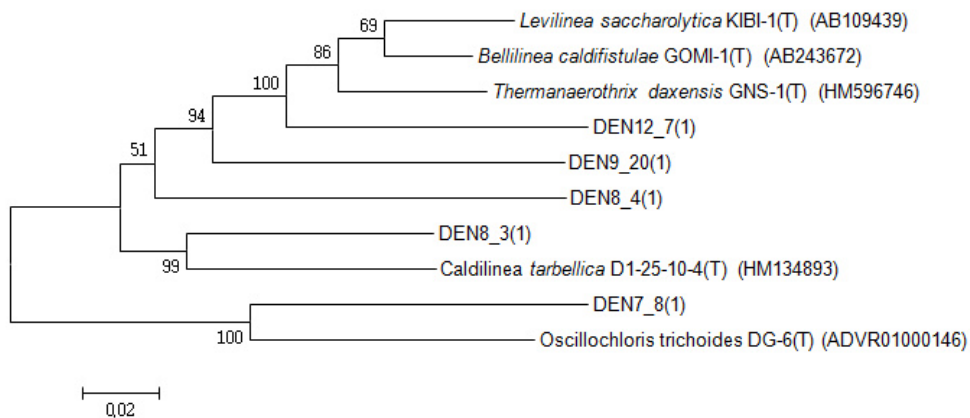


Fig. a-7. Phylogenetic tree of Chloroflexi Phylum at phase II

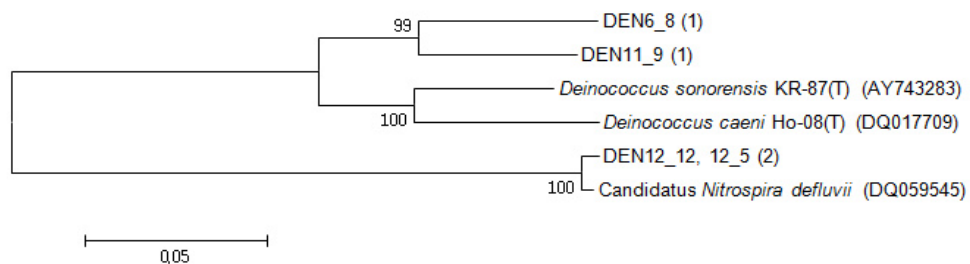


Fig. a-8. Phylogenetic tree of Nitrospirae and Deinococcus phylum at phase III



## 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공학박사학위논문

실규모 상향류식 유동상반응기에서  
탈질제한인자와 탈질균간의  
상관관계 연구

A study on the correlation between control factors  
and denitrifiers in a full-scale denitrifying upflow  
fluidized bed reactor (FBR)

2014년 8월

서울대학교 대학원  
지구환경시스템공학부  
김 주 성

# 실규모 상향류식 유동상반응기에서 탈질제한인자와 탈질균간의 상관관계 연구

지도교수 조 희 찬

이 논문을 공학박사 학위논문으로 제출함  
2014년 5월

서울대학교 대학원  
지구환경시스템공학부  
김 주 성

김주성의 박사 학위논문을 인준함  
2014년 6월

위 원 장 \_\_\_\_\_ (인)

부위원장 \_\_\_\_\_ (인)

위 원 \_\_\_\_\_ (인)

위 원 \_\_\_\_\_ (인)

위 원 \_\_\_\_\_ (인)

## 초 록

질소와 인은 부영양화의 원인물질로써 수중에 존재하는 과량의 질산성질소는 발암물질을 형성할 수 있고 아질산성질소와 함께 청색증을 유발하기도 한다.

2012년 이후 총인이 하천에 유입되는 것을 방지하기 위해 대부분의 하수종말처리시설에 대해 총인을 0.2mg/L 이하로 배출하도록 기준을 강화하였다. 하지만 고도처리 시설을 설치하였음에도 불구하고 조류 주의보는 2013년 이후에도 계속 발령되었으며 정부는 이러한 부영양화 문제를 해결하기 위해 공공하수처리시설에 대해 2012년부터 계절과 지역에 관계없이 총질소 배출허용기준을 20mg/L 이하로 강화하였다.

일반적인 하·폐수의 질소제거 방법으로는 물리화학적 처리방법과 생물학적 처리방법이 있다. 물리화학적 처리는 처리효율이 일정하고 폐수 내 독성물질 등이 존재하더라도 처리가 가능한 장점이 있는 반면 전기화학적인 방법을 이용하거나 염화아연, 알루미늄파우더 등을 이용하기 때문에 생물학적 처리보다 비용이 많이 들고 운영·관리하는 측면에서는 특별한 지식을 요구하는 경우가 많아 적용이 제한적일 수 있다.

생물학적 질소제거는 종속영양미생물을 이용하는 방법과 독립영양미생물을 이용하는 방법으로 나눌 수 있는데 우리나라의 하수처리장에서는 대부분 종속영양미생물을 이용한 탈질 방법을 사용하고 있다. 종속영양 탈질은 호기성 미생물을 이용하여 암모니아를 질산성질소로 산화시킨 후, 메탄올, 에탄올 등과 같은 유기탄소원을 주입하여 혐의성 미생물로 탈질하는 방법이다.

본 연구의 상향류식 유동상반응기는 총인 제거를 위하여 전국 하수처리장 50여 곳에 설치되었으며 기 설치된 상향류식 유동상반응기

로 총인뿐만 아니라 총질소도 안정적으로 처리할 수 있다면 비용 경제적인 접근방법일 것이다. 따라서 본 연구에서는 상향류식 유동상반응기를 이용하여 총질소를 처리할 수 있는 지를 판단하고 최적의 운전인자를 도출하는 데 목적을 두었다. 이를 위해 첫째, 온도와 탈질효율간의 상관관계를 분석하였고 둘째, 메탄올 주입량과 탈질효율간의 상관관계를 분석하여 최적의 메탄올주입량(C/N ratio)을 도출하였으며 셋째, 실용적인 관점에서 메탄올 주입 전 유입수의 용존산소 상한을 분석하였다. 넷째, 용존산소와 온도가 변화될 때 우점하는 미생물 종이 어떻게 변화하는지 상호관계를 분석하였다.

이를 위해 실험규모의 파일럿플랜트(Pilot plant)를 하수처리장에 설치하여 운영하였으며 수질항목 조사분석은 COD<sub>Mn</sub>을 standard methods(APHA, AWWA and WPCF, 1995)로 분석하였고 유량은 on-line 자동측정기인 Green Flowmeter SSM100(SSMI, Korea), 질산성질소는 HACH DR890(HACH Co, USA)과 on-line 자동측정기인 NITRATAX plus(HACH Co, USA)를 사용하였으며, 용존산소는 HACH 200<sup>TM</sup> Universal Controller(HACH Co, USA)를 사용하였고 온도(T)는 하수처리장의 TMS(Telemetering system) 방류수질 자료를 사용하였다. 또한 미생물의 분석은 16S rRNA 기법을 사용하였다.

경험적 온도상수  $\theta$ 는 1.165였으며 C/N비 ( $\text{COD}_{\text{closed}}/\text{NO}_3^- - \text{N}_{\text{removed}}$ )는 메탄올을 기준으로 4.65였다. 또한 메탄올 주입 전 유입수의 용존산소 상한은 1.9mg/L였다. 용존산소와 온도가 변화하면 우점하는 미생물 종이 어떻게 변화하는지 상호 연관관계를 분석한 결과, 발견한 중요 미생물은 저온 탈질미생물인 Flavobacteriales와 미세산소조건(Micro-aerobic condition)에서 불완전한 탈질을 하는 *Methylothermobacter*와 *Methylothermobacter mobilis*로 밝혀졌다.

본 연구의 결과는 총질소 제거 등의 수질개선 및 하천의 유지용수 등으로 충분히 활용 가능한 수질을 확보할 수 있는 기술적인 정보를 제공하여 생태계를 안정시키는데 기여할 것이다. 또한 총인처리를 목적으로 전국 하수처리시설에 기 설치되어 있는 상향류식 유동상반응기로 총질소도 처리할 수 있게 함으로써 오염물질 처리대상을 확장함은 물론 필수적인 운전 조건을 제공하여 설비운영에 용이성과 경제성을 부여하기를 기대한다. 더욱이 실규모 반응기에서 분석했기 때문에 실용적이며 현장 적용을 쉽게 할 것으로 판단된다. 마지막으로 본 연구에서 수행한 운전조건 변화와 미생물 우점종간의 상호관계는 특정 증식환경에 적합한 미생물을 집중적으로 배양할 수 있는 단초가 되기를 기대한다.

주요어 : 탈질 제한인자, 상향류식 유동상반응기, *Flavobacteriales*, *Methylothera spp.*, 미세산소상태 (Micro-aerobic condition)

학 번 : 99411-803

# 목 차

1. 서 론 .....	1
1.1. 연구배경 .....	1
1.2. 연구목적 .....	7
2. 이론적 배경 .....	11
2.1. 생물학적 탈질 공정 .....	11
2.1.1. 독립영양 탈질 공정 .....	11
2.1.2. 종속영양 탈질 공정 .....	12
2.1.3. 충전상 생물막 공정 .....	17
2.2. 탈질 이론 및 제한인자 .....	21
2.2.1. 탈질 양론 .....	21
2.2.2. C/N비 .....	28
2.2.3. 온도 .....	30
2.2.4. 용존산소 .....	32
2.3. 탈질 미생물과 우점도 .....	35
2.3.1. 주요 탈질 미생물 .....	35
2.3.2. 우점도 분석 이론 .....	39



<b>3. 재료 및 방법</b>	<b>49</b>
3.1. 반응기 구성과 운전	51
3.1.1. 상향류식 유동상반응기 구성	51
3.1.2. 상향류식 유동상반응기 운전원리	55
3.2. 실험방법	58
3.2.1. 실험단계 분류	58
3.2.2. 운전 조건	59
3.3. 분석방법	62
3.3.1. 제한인자 분석	62
3.3.2. 우점도 분석	63
 <b>4. 상향류식 유동상반응기에서 제한인자와 탈질효율</b>	 <b>67</b>
4.1. 최적 C/N비	67
4.2. 온도	69
4.3. 유입 용존산소 상한	72
4.4. 결론	76
 <b>5. 상향류식 유동상반응기에서 제한인자와 탈질균</b>	 <b>78</b>
5.1. 생활성 평가 및 T-RFLP 분석	78
5.1.1. 생활성도 평가	78
5.1.2. T-RFLP 분석	80
5.2. 우점도 및 생화학적 특성	82

5.2.1. 실험단계별 우점도 .....	85
5.2.2. 미생물의 생화학적 특성 .....	93
5.2.3. 탈질 우점균 .....	96
5.3. 제한인자와 탈질 우점균의 상관관계 분석 .....	98
5.3.1. 온도와 탈질 우점균의 상관관계 .....	98
5.3.2. 용존산소와 탈질 우점균의 상관관계 .....	100
5.4. 결론 .....	104
 6. 결 론 .....	 107
 참 고 문 헌 .....	 111
 Abstract .....	 125
 Appendix .....	 130

## 표 목 차

Table 1-1. The standards of the quality of the effluent water discharged from sewage treatment plant on SAWERAGE ACT in Korea .....	2
Table 1-2. Processes of denitrification and dephosphorus	4
Table 2-1. Relative merits and demerits for processes of denitrification and dephosphorus .....	13
Table 2-2. Comparison of alternative carbon sources in post-denitrifying MBBRs .....	29
Table 2-3. Values for Arrhenius temperature coefficients	30
Table 2-4. Permissible DO concentrations for denitrification .....	34
Table 2-5. Organisms performing various activities in nitrogen cycle .....	36
Table 2-6. Primers for live/dead cell staining .....	41
Table 3-1. Water quality of the effluent discharged from C sewage treatment plant .....	50
Table 3-2. Specification of the full-scale FBR .....	52
Table 3-3. Media Specitication of the full-scale FBR .....	53
Table 3-4. phases based on temperature .....	59
Table 3-5. Operating condition of the full-scale FBR .....	61

Table 3–6. 16S rRNA analysis used in this study .....	66
Table 4–1. C/N ratio and SDNR <sub>max</sub> on each phase .....	68
Table 4–2. Temperature of influent waste water .....	69
Table 4–3. DO and NO <sub>3</sub> <sup>–</sup> –N of influent waste water .....	72
Table 4–4. DO of influent waste water and SDNR .....	74
Table 4–5. C/N ratio and DO <sub>max</sub> on each phase .....	75
Table 5–1. Phylogenic information of OTUs .....	84
Table 5–2. Bacterial community structure of the methylotrophic denitrification consortium in phase I .....	86
Table 5–3. Bacterial community structure of the methylotrophic denitrification consortium in phase II .....	89
Table 5–4. Bacterial community structure of the methylotrophic denitrification consortium in phase III .....	91
Table 5–5. Denitrifiers and Methylophilales found in FBR 97	
Table 5–6. Relative abundance of denitrifiers and Methylophilales on temperature in each phase	99
Table 5–7. Relative abundance of denitrifiers and Methylophilales on influent DO in each phase .....	101

## 그 립 목 차

Fig. 1-1. Flowchart of this study .....	10
Fig. 2-1. A <sub>2</sub> O process .....	14
Fig. 2-2. Bardenpho process .....	15
Fig. 2-3. UCT and Modified UCT process .....	16
Fig. 2-4. Use of the electron doner for energy production and cell synthesis .....	22
Fig. 2-5. Correlation between denitrification rate and temperature .....	32
Fig. 2-6. Nitrogen cycle .....	36
Fig. 2-7. The principle of PCR .....	42
Fig. 2-8. The process of T-RFLP analysis .....	44
Fig. 2-9. The process of clone library .....	46
Fig. 2-10. Sequencing by Sanger methods .....	46
Fig. 2-11. Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences at phase I .....	48
Fig. 3-1. Piping & instrument diagram of the full-scale FBR .....	51
Fig. 3-2. Connected FBR with C sewage treatment plant	54
Fig. 3-3. Picture of the full-scale FBR .....	55
Fig. 3-4. Schematic diagram of FBR .....	57
Fig. 3-5. Flow rate of influent waste water in this study	60

Fig. 3-6. Head loss and HRT of FBR in this study .....	62
Fig. 4-1. Dosed CODMeOH and C/N ratio of FBR in this study .....	68
Fig. 4-2. SDNR with temperature of FBR in this study ..	69
Fig. 4-3. Correlation between temperature and SDNR in the methanol dosed by formula 2-21 .....	71
Fig. 4-4. Influent and effluent DO of FBR in this study ..	73
Fig. 4-5. Influent and effluent $\text{NO}_3^-$ -N of FBR in this study .....	73
Fig. 4-6. Comparison the temperature correction factor( $\theta$ ) in this study and the others .....	77
Fig. 5-1. Results of Live/dead cell staining in this study	79
Fig. 5-2. Results of 27F-FAM analysis in this study .....	81
Fig. 5-3. Results of 518R-HEX analysis in this study ..	81
Fig. 5-4. Bacterial community structure of the methylotrophic denitrification consortium on phylum/class levels and order level in phase I .....	87
Fig. 5-5. Bacterial community structure of the methylotrophic denitrification consortium on phylum/class levels and order level in phase II .....	90
Fig. 5-6. Bacterial community structure of	

the methylotrophic denitrification consortium on phylum/class levels and order level in phase III	92
Fig. 5–7. Denitrifiers and Methylophilales to be or not on temperature in each phase	99
Fig. 5–8. Denitrifiers and Methylophilales to be or not on influent DO in each phase	102
Fig. a–1. Phylogenetic tree of $\alpha$ –proteobacteria at phase II	130
Fig. a–2. Phylogenetic tree of Methylophilales group of $\beta$ –proteobacteria at phase II	131
Fig. a–3. Phylogenetic tree of the group without Methylophilales in $\beta$ –proteobacteria at phase II	132
Fig. a–4. phylogenetic tree of $\gamma$ –proteobacteria at phase II	133
Fig. a–5. Phylogenetic tree of $\delta$ –proteobacteria at phase II	133
Fig. a–6. Phylogenetic tree of Bacteroidetes phylum at phase II	134
Fig. a–7. Phylogenetic tree of Chloroflexi Phylum at phase II	135
Fig. a–8. Phylogenetic tree of Nitrospirae and Deinococcus phylum at phase III	135

# 1. 서 론

## 1.1. 연구배경

질소는 자연생태계에 없어서는 안 될 중요한 순환자원이며 영양소의 한가지이다. 급격한 인구집중, 도시화와 산업발달로 인해 질소와 인을 함유한 오염물질이 특정 수계와 유역에 집중되어 환경문제를 야기하고 있다. 질소와 인이 생태계의 자정한계를 초과해서 유입되면 플랑크톤의 번성 및 성장을 초래한다(An KG et al., 2000). 플랑크톤이 이상 증식된 물에서는 악취가 나고, 탁도가 높아지며 용존산소가 고갈되어 수중 생물들을 죽음에 이르게 한다. 우리나라는 해마다 여름이면 주요 하천이나 댐에서 부영양화 현상이 주기적으로 발생하고 있다. 또한 부영양화 원인물질인 질산성질소는 발암물질인 nitrosoamine을 형성할 수 있고 아질산성질소와 함께 사람의 혈액 내의 헤모글로빈을 산화시켜 산소 전달을 방해하는 청색증(methemoglobinemia)을 유발하기도 한다(<http://en.wikipedia.org/wiki/Methemoglobinemia>).

우리나라는 이러한 수질오염문제를 해결하기 위하여 1966년에 하수도법을 제정한 이후 오염 현안과 현상을 반영하여 최근까지 개정해 오고 있다. 근래에 정부는 질소와 인으로 인해 발생하는 환경문제를 인지하고 기존의 배출허용기준 항목인 BOD, COD, SS 등의 유기물 중심 규제에 더하여 영양염류 항목을 추가하고, 2001년 말에 총인·총질소의 배출허용기준 강화를 목적으로 하수도법 시행규칙 제6조 제1항을 신설하였다.



총질소 배출허용기준을 보면 2012년까지는 동절기에 수온이 낮아 탈질이 원활하지 못한 기술적인 문제 때문에 지역별로 60mg/L이하로 기준을 완화·적용해 왔으나 2012년부터는 하수처리용량이 500m<sup>3</sup> 이상인 공공하수처리시설의 방류수 총질소 농도를 계절과 지역에 관계없이 20mg/L 이하로 규제기준을 강화하였다(환경부, 2012; Table 1-1). 또한 2015년부터는 1일 하수처리용량이 500m<sup>3</sup> 미만인 경우도 총질소를 20mg/L 이하로 처리하여 배출하여야 한다.

Table 1-1. The standards of the quality of the effluent water discharged from sewage treatment plant on SAWERAGE ACT in Korea

연도 및 지역	BOD (mg/L)	COD <sub>Mn</sub> (mg/L)	SS (mg/L)	T-N (mg/L)	T-P (mg/L)	E-C (개/L)	TU	
~ '95	30 이하	50 이하	70 이하	—	—	—	—	
'96 ~ '99	20 이하	40 이하	20 이하	60 이하	8 이하	—	—	
'00~ '01	특별대책지역 실수중보권역	10 이하	40 이하	10 이하	20 이하	2 이하	—	—
	기타지역	20 이하	40 이하	20 이하	60 이하	8 이하	—	—
'02~ '07	특정지역 기준	10 이하	40 이하	10 이하	20 이하	2 이하	3,000 이하	—
	기타지역 기준	20 이하	40 이하	20 이하	60 이하	8 이하		
'08 ~ '11	10 이하	40 이하	10 이하	20 이하	2 이하	3,000 이하	1	
'12~	I 지역	5 이하	20 이하	10 이하	20 이하	0.2 이하	1,000 이하	1
	II 지역	5 이하	20 이하	10 이하	20 이하	0.3 이하	3,000 이하	
	III 지역	10 이하	40 이하	10 이하	20 이하	0.5 이하		
	IV 지역	10 이하	40 이하	10 이하	20 이하	2 이하		

하·폐수의 질소제거 방법으로는 물리화학적 방법과 생물학적 방법이 있다. 물리화학적인 방법에 대한 연구는 공기 탈기(air stripping), 파괴점 염소주입(breakpoint chlorination), 선택적 이온교환(selective ion exchanger), 화학적 환원, 전기투석, 화학적 침전 등이 있다. 물리화학적 처리는 생물학적 처리방법에 비해 처리효율이 일정하고 폐수 내에 독성물질이 존재하더라도 처리가 가능하다는 장점이 있는 반면, 전기와 같은 에너지를 사용하거나 염화아연, 알루미늄파우더 등과 같은 화학물질을 이용하기 때문에 생물학적 방법보다 비용이 많이 들고 특별한 지식을 요구하는 경우가 많다.

최근 생물학적인 질소제거 방법에 대한 연구는 ANAMMOX(anaerobic ammonia oxidation), 독립영양 탈질, 중속영양 탈질 등이 있다. ANAMMOX 공정은 기존에 있던 생물학적 질소 순환 이론을 깨는 것으로서 혐기조건에서 아질산염을 전자 수용체로 하여 암모늄 이온을 질소가스로 전환하는 생화학 과정이 1941년 바다에서 발견되면서 시작되었다(Dalsgaard et al, 2005). Mulder(1987)가 탈질 파일럿 반응조에서 질산염이 존재하는 상태에서 암모늄이온이 없어지는 현상을 확인하고 이를 ANAMMOX라고 명명하였고, Kuenen(2008)은 이 반응을 과학적으로 증명하였다. ANAMMOX는 암모늄 이온을 질소가스로 바로 전환할 수 있는 장점에도 불구하고 온도조건, 용존산소 민감성 등으로 인해 실용화에는 시간이 필요할 것으로 사료된다. 독립영양탈질은 국내외에서 주로 황(S)을 이용한 탈질 방법이 연구되고 있다(Ahmed et al, 2012). 그러나 중속영양탈질에 비해 경제적인 방법이지만 고농도 질산성질소에 대한 처리능력(Capacity)의 한계, 장치가 막히고 pH가 저하되는 등의 문제가 있어 연구소와 학계를 중심으로 이를 개선하려는 연구가 계속되고 있다(김인수, 2001; Moraes et al., 2012).

중속영양탈질은 호기성 미생물을 이용하여 암모니아를 질산성질소로 산화시킨 후(nitrification), 메탄올, 에탄올 등과 같은 외인성 유기탄소원을 주입하여 혐의성 미생물로 탈질한 후, 질소가스로 배출하는 방법이며 가장 많이 적용되고 있는 방법이다. 중속영양 탈질 공정은 무산조의 위치에 따라 전탈질과 후탈질 공정으로 분류된다. 전탈질 공정은 폐수내의 유기물을 탄소원으로 사용하여 질소를 제거하는 공정으로서 전형적인 Modified Bardenpho, AO, A<sub>2</sub>O, Phostrip, UCT 공정이 있으며 이들을 변형한 DNR(Daewoo nutrient removal) process, STAR(Samsung tetra a reactor) process, HBR process((주)한미), HDF process(한화), SDPRS(SK) 등이 있다(Table 1-2).

Table 1-2. Processes of denitrification and dephosphorus

type	process name
A <sub>2</sub> O	DNR, HDF, HIBNR, DBS, P/L II, MLE, A <sub>2</sub> O, BNR, PID, Anaerobic & Aerobic(STEP type Anaerobic & oxic, Two Anaerobic & oxic), Long aeration with intermittent discharge, CSBR, Bio-NET, VIP, MUCT, POBR, Bardenpho, PADDO, DASPro, KHBNR, Den & P, HNR, Phostrip II, KSBNR, STAR, TEC-BNR, SENS, KNR, A2O2, ASA, AO, AOSB, SAMCO, MS-BNR, DeNiPho(Catalytic oxidation with intermittent aeration )
MEDIA	BIO-SAC BNR, BIOFIL, NPR, CNR, HINT, MPM Phosphates Recovery Process, RID & inner cycle denitrification, SWPP(Tertiary catalytic oxidation), Ciliary media, HYDEN, Coating microorganism contact treatment, HFBF, SDPR, SM, SBAF
SBR	PSBR, MSBR(Aqua), BIOGEST-SBR, KIDEA(CSTR active sludge, ICEAS, CASS, BCS, NAM, Omniflo, Air-vent SBR, Fluidyne, TSBR
others	ACS, BCF, BSTS-II, Coagulant cycle, Pure O <sub>2</sub> aeration, HBR-II, B <sub>3</sub> , KOMIAE, NAP, NPTS, Seil, HANT, OSAWA, Bio-Combinator, Biofor, Biostyr, S-BC, e-BNR, Azenit-P, ODIS, SBF, PhiCD, Symbio, RBC and others

대규모 하수처리장의 경우에는 Table 1-2의 연속 흐름식 공정이 적용되고 있으나 공정에 따라 2~5개 이상의 독립적인 반응조와 말단의 침전조를 설치해야 하기 때문에 넓은 부지가 필요해서 중소규모의 고도처리에는 적합하지 않다. 따라서 중소규모 하수처리장에는 유입유량의 탄력적인 대응을 목적으로 SBR(Sequencing Batch Reactor)기술이 많이 적용되고 있다. 그러나 이 공정들은 미생물과 처리수의 고액분리를 중력 침강으로 하기 때문에 미생물의 농도를 높게 유지하기가 어려우며, 유입부하가 갑작스럽게 변동되면 미생물이 유실되어 효율적인 처리가 어려울 수 있다. MBR(Membrane Bio-reactor)은 작은 규모에서도 경제적이고 자동화가 용이하며 운전이 간편하고 높은 처리 효율을 보이기 때문에 소규모 하수처리장에 적합하지만 막의 오염으로 인한 성능저하 때문에 성능 회복을 위해서 주기적으로 세척하거나 막을 교체해야 하는 문제가 있을 수 있다.

반면 상향류식 유동상반응기는 다른 시스템에 비해 수리학적 체류시간이 훨씬 짧아서 작은 규모로도 대용량의 하·폐수를 처리할 수 있으며 설치부지와 증설비용이 작고 여재 교체도 불필요하기 때문에 경제적이다. 탈질에 소요되는 수리학적 체류시간은 A<sub>2</sub>O공정 1~2.5hr, 5단 Bardenpho공정 5~10hr, UCT공정 5~10hr 그리고 VIP공정 2~4hr이다(환경부, 2005). 이에 비하여 상향류식 유동상반응기는 10분 이내에 처리가 가능하다고 보고된 바 있다(Bruce E. Rittman et al., 2002). 상향류식 유동상반응기는 연속완전혼합조와 같은 환경을 제공하기 위해 여재를 강제로 순환시키는 방법(Brito, A.G. et al., 1997)을 사용하는데 순환과정에서 미생물의 부착과 탈착을 반복하고, 느린 속도로 침전하면서 2차 처리수와 접촉하기 때문에 미생물과 하수사이의 접

촉면적을 최대로 높이는 시스템이다(Lettinga et al., 1991). 따라서 기존 응집 설비에 비하여 적은 약품량과 외인성 유기탄소원으로도 총인·총질소 처리가 가능할 것으로 생각된다. 이러한 내부순환방법의 장점때문에 UASB(Nicolella, C., 2000)나 ANAMMOX에서도 미생물과 하수의 접촉면적을 증가시키기 위해 상향류식 유동상반응기를 사용하기도 한다(Chen et al., 2011).

이러한 장점들로 인해 국내에는 상향류식 유동상반응기가 총인 제거를 목적으로 50여 곳의 하수처리장에 설치되었거나 설치될 예정이다. 따라서 공공하수처리장에 기 설치된 상향류식 유동상반응기로 총인 뿐만 아니라 총질소도 안정적으로 처리한다면 경제적인 것이다. 우리나라에서는 상향류식 유동상반응기를 질소제거에 사용한 적이 없으나, 이미 미국에서는 full-scale로 적용하고 있다(US EPA, 2010b). 이에 본 연구에서는 pilot scale의 상향류식 유동상반응기를 이용하여 종속영양 탈질 가능 여부를 확인하고, 특히 탈질 제한인자와 미생물 분석을 통해 탈질 최적조건을 도출하고자 하였다.

## 1.2. 연구목적

질소처리를 위해 상향류식 유동상반응기를 생물학적으로 이용하려면 미생물의 증식환경에 대한 분석이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 상향류식 유동상반응기의 생물학적 탈질 가능성 확인뿐 아니라 운전요소를 최적화하고자 하였다. 이에 따라 실규모의 상향류식 유동상반응기(FBR, Fluidized Bed Reactor)를 경기도 용인 C하수처리장에 설치하였다.

탈질효율은 온도와 비례한다. 동절기에 하수의 온도조건을 20℃ 이상으로 유지하려면 에너지를 사용할 수밖에 없어 비용문제를 초래한다. 저온의 영향을 상쇄할 수 있는 방법으로는 운전요소 변경, 체류시간 연장, 저온탈질균 투입 등이 있을 수 있다. 이를 판단하기 위해서 온도와 탈질효율간의 상관관계 분석을 첫 번째 목적으로 하였다.

하수처리시설의 2차 처리수에는 탈질미생물이 섭취할 수 있는 유기탄소원이 부족하다. 탈질에 관여하는 종속영양 미생물들에게 전자공여체로서 외인성 유기탄소원을 주입해 주어야 할 필요가 있다. 외인성 유기탄소원으로는 주로 메탄올, 에탄올, 아세트이트 등을 사용한다. 하수처리장에서는 질산성질소 제거효율과 경제적인 측면에서 3차 고도처리(tertiary treatment)에 주로 메탄올을 사용하고 있다(Jeong et al., 2006). 메탄올을 이용하는 가장 큰 이유는 다른 탄소원에 비해 저가이기 때문에 운영비용을 감소시킬 수 있다. 따라서 상향류식 유동상반응기에서 메탄올 주입량과 탈질효율(SDNR, specific denitrification ratio)간의 상관관계를 분석하여 최적의 메탄올주입량(C/N ratio) 도출을 두 번째 목적으로 하였다.

또한 용존산소는 대표적인 탈질 제한인자이다. 지금까지 대부분의 연구가 반응기 내부 용존산소 상태를 다루고 있으나 본 연구에서는

실용적인 관점에서 메탄올 주입 전 유입수의 용존산소 상한을 분석하는 것을 세번째 목적으로 하였다.

현재까지 환경공정의 해석은 주로 운전요소와 제한인자의 인위적 또는 비인위적 변화에 의한 처리효율과의 상관성 분석에 집중해 왔다. 또한 미생물에 관한 생물학적, 생태학적 연구가 진행되었다 하더라도 실험실규모에 머무르고 있을 뿐만 아니라(Baytshtok et al., 2008; 2009), 메탄올을 이용하는 탈질미생물의 기능과 유전학적 특성에 집중되어 있어(Chistoserdova, 2011) 탈질조건과 메탄올 이용 탈질 미생물 간 상호관계에 관한 연구는 부족한 실정이다.

복잡한 탈질 메커니즘에서 미생물 증식환경이 변화함에 따라 메탄올이용 탈질 우점 미생물 군집 내에 존재하는 각각의 종도 변화할 것이다. 따라서 미생물종을 중심으로 생물학적 탈질효율을 증대시킬 수 있는 단초를 마련하기 위해 용존산소와 온도가 변화하면 우점하는 미생물 종이 어떻게 변화하는지 상호 연관관계를 분석하는 것을 네 번째 목적으로 하였다.

이를 위한 본 연구의 방법을 요약하면 먼저 상향류식 유동상반응기 운전 시 변화를 줄 수 있는 운전요소(control factor), 외부적인 환경요인으로 변화를 줄 수 없는 항목(external fixed factor) 그리고 물리적인 환경과 관련된 항목(physical condition)으로 나누었다(Fig. 1-1).

운전요소는 용존산소, 외인성 유기탄소원주입량 그리고 질산성질소 부하량 등이고, 외부적으로 결정되어 반응기에 절대적인 영향을 미치는 인자(external fixed factor)는 온도로 구분하였다. 또한 반응기와 관련한 물리적인 조건 항목으로는 유입유량(flow rate), 반류유량(reject flow rate), 여재의 순환율(turn over rate)로 분류하였다.

유입구(inlet)과 유출구(outlet)에서 각각 시료를 채취하여 질산성 질소, 용존산소, 화학적산소요구량(COD) 등의 수질을 파악하고 온도와 용존산소 등은 현장에서 측정하였다.

그리고 미생물 분석용 시료를 채취하여 DNA를 추출(extraction)하고 배양하여 중합효소연쇄반응(PCR-Polymers chain reaction)으로 증폭(amplification)한 후 염기서열을 분석(sequencing)하였다. 분석 결과로 계통학적 분류도(phylogenetic tree)를 작성하였다. 각각의 염기서열을 유전자정보 DB와 비교하여 유사도(similarity) 97% 이상의 OTUs (operational taxonomic units) 만을 NCBI (National Center for Biotechnology Information)에 등록하고, EzTaxon server에서 이들의 생화학적 특성을 조사하였다.

끝으로 제한인자와 수질자료를 분석하여 최적의 운전조건을 도출한 후, 미생물 정보와 비교·분석하여 상호 연관관계를 밝혔다.

본 연구의 결과는 수질개선 및 하천의 유지용수 등으로 충분히 활용 가능한 수질을 확보할 수 있는 기술적인 정보를 제공하여 생태계를 안정시키는데 기여할 것이다. 또한 총인처리를 목적으로 전국 하수처리시설에 설치되어 있는 상향류식 유동상반응기로 총질소도 처리할 수 있게 함으로써 오염물질 처리대상을 확장함은 물론 필수적인 운전조건을 제공하여 설비운영에 용이성과 경제성을 부여하기를 기대한다. 더욱이 실규모 반응기에서 분석했기 때문에 실용적이며 현장 적용을 쉽게 할 것이다. 마지막으로 본 연구에서 수행한 운전조건 변화와 미생물 우점종간의 상호관계는 특정 증식환경에 적합한 미생물을 집중적으로 배양할 수 있는 단초가 되기를 기대한다.



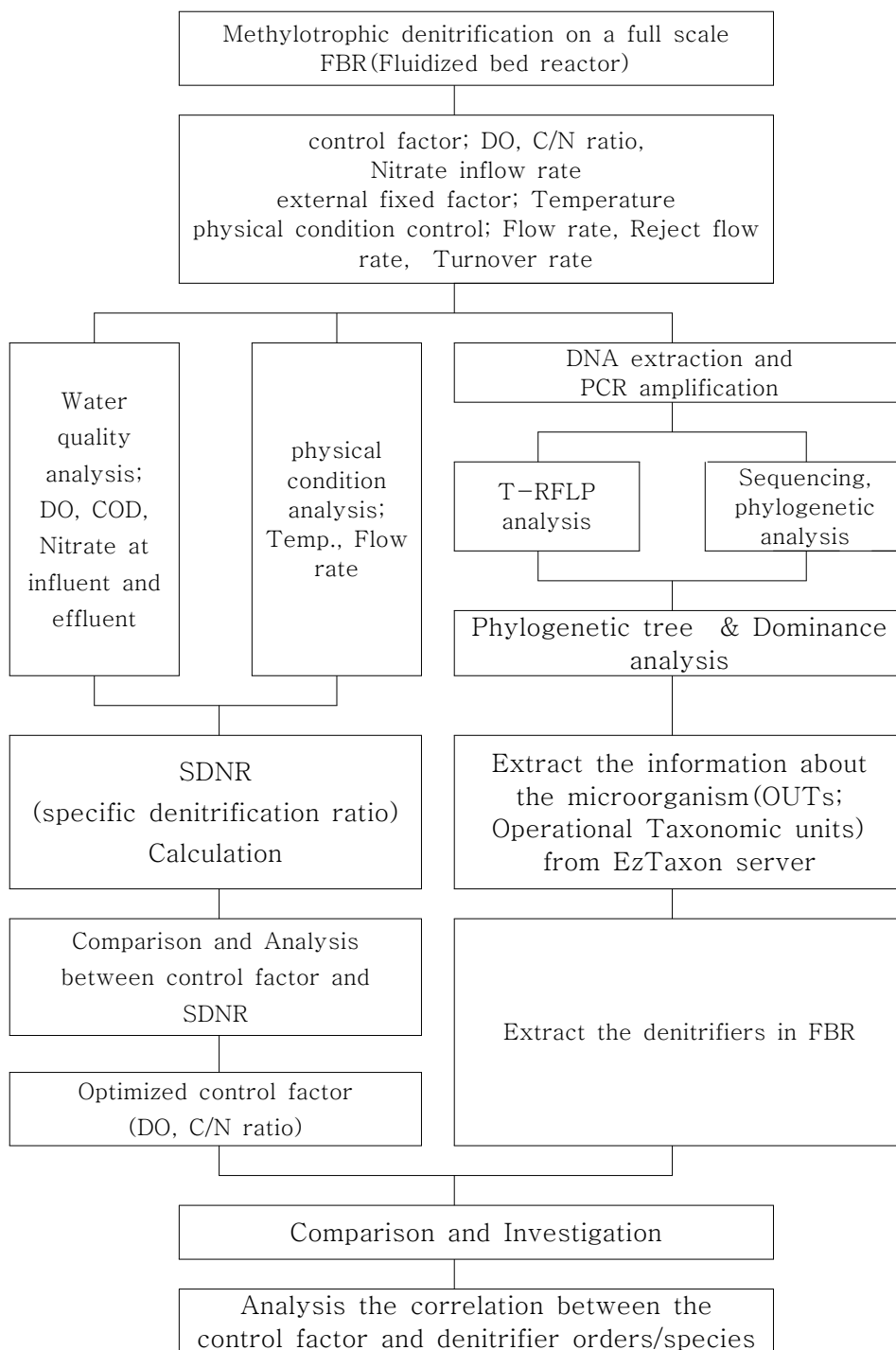


Fig. 1-1. Flowchart of this study

## 2. 이론적 배경

### 2.1. 생물학적 탈질 공정

#### 2.1.1. 독립영양 탈질 공정

축산폐수와 같이 C/N비가 낮은 폐수, 질산성질소농도가 높은 산업폐수의 경우 메탄올과 같은 값이 비싼 외부 탄소원 없이 값이 저렴한 황을 이용하여 황산화 탈질미생물에 의해 탈질을 유도하는 장점을 보유하고 있어 독립영양탈질 공정이 국내외에서 이에 대한 연구가 진행되고 있다. 황을 이용한 독립영양탈질 공정은 황산화 탈질균이 여러 종류의 황화합물을 황산염이온으로 산화시키면서 동시에 질산성질소를 질소가스 형태로 전환시키는 원리를 이용한다.

황산화 탈질균은 독립영양 미생물이므로 외부 탄소원이 필요하지 않고, C/N비가 낮은 폐수에 메탄올 대신 값이 싼 황을 투입으로 경제적이며 처리효율이 안정적이고 운전이 쉬운 효과적인 탈질화를 유도할 수 있다. 그러나 초기 적용시 독립영양 탈질균의 우점화 및 보유가 어렵고, 탈질시 알칼리도가 파괴되어 pH가 저하되며, pH가 6.2 이하로 저하시 탈질 효율은 급격히 감소하며, 알칼리도가 낮아지면 탈질이 되지 않거나 고농도의 탈질은 매우 어렵다는 단점이 있다(US EPA, 2009).

이러한 독립영양탈질 공정은 축산폐수뿐 아니라 분뇨, 산업폐수, 침출수, 지하수 등의 낮은 질산성질소 함유 폐수에 적합한 처리공정으로 이용될 수 있다. 그러나 황을 이용한 독립영양 탈질공정은 현재까지 실

험실 수준에서만 연구가 진행되고 있고, 실제 500ppm 이상의 고농도 질산성질소를 함유한 폐수에 적용된 사례는 거의 없다(녹색환경기술, 2005).

### 2.1.2. 종속영양 탈질 공정

종속영양 미생물을 이용한 탈질은 미국 오대호와 체사픽만 등에서 심각한 부영양화가 대두된 1970년대부터 종속영양 탈질을 이용한 질소 및 인 제거 연구가 활발히 시작되었다. 1980년을 기점으로 전 세계적으로 Modified Bardenpho, A/O, A2/O, Phostrip, UCT 등 수많은 질소·인 제거 공정이 등장하였고 이 같은 공정들은 광범위하게 하수처리에 적용되어왔다.

종속영양 탈질은 무산소조의 위치에 따라 전탈질(pre-denitrification)과 후탈질(post-denitrification) 공정으로 나눈다. 전탈질 공정은 폐수내의 유기물을 탄소원으로 사용하여 질소를 제거하는 공정이다. 따라서 외부에서 탄소원을 추가로 공급해줘야 하는 후탈질에 비해 유기물 비용면에서는 경제적이지만 탈질율이 75%이하로 알려져 있어 높은 탈질율을 기대하기는 어렵다. 따라서 낮은 농도로 처리해야 할 경우에는 후단에 후탈질 공정을 두어 다시 탈질해야 한다(US EPA, 2009).

후탈질 공정은 외부탄소원을 인위적으로 주입하여야 하는 공정으로서 부착성장공정이나 부유성장공정으로 운전된다. 유입수의 질산성 질소 농도변화에 매우 민감하며, 외부탄소원 공급을 적절히 조절하지 않으면 효율이 떨어지거나 COD상승으로 인해 뒤에 추가로 유기물제거 공정이 필요할 수도 있다. 본 연구는 COD제거를 위한 추가공정이 없는 후

탈질공정을 최적화하기 위한 것이다.

유기물의 농도가 높은 폐수의 탈질공정으로는 중속영양탈질이 매우 경제적으로 운전될 수 있지만, 우리나라와 같이 유기물 농도가 질소농도에 비해 낮은 경우는 추가적으로 메탄올이나 아세테이트와 같은 가격이 비싼 유기물을 주입하여 탈질반응을 유도시켜야 하므로 대량의 질산성질소함유 폐수처리에는 비용이 매우 커지는 단점이 있기 때문에 적절한 C/N비를 유지하는 것이 중요하다.

질소제거공정은 다양하지만 실제로는 대부분 기본적인 공정의 변형이어서 기본적인 공정만을 Table 2-1에 정리하고 각각을 설명하였다(US EPA, 2010b).

Table 2-1. Relative merits and demerits for processes of denitrification and dephosphorus

설계변수/ 장단점	Process			
	A <sub>2</sub> O	Bardenpho	UCT	VIP
F/M, day <sup>-1</sup> , (BOD)	0.15 - 0.25	0.1 - 0.2	0.1 - 0.2	0.1 - 0.2
HRT, hr				
혐기조	0.5 - 1.5	1 - 2	1 - 2	1 - 2
무산소조(1)	0.5 - 1.0	2 - 4	2 - 4	1 - 2
호기조(1)	3.5 - 6.0	4 - 12	4 - 12	2.5 - 4
무산소조(2)		2 - 4	2 - 4	
호기조(2)		0.5 - 1		
장점	폐슬러지에 인함량이 높음. A/O 대비 질 우수.	슬러지 생성량 최소. 폐슬러지 내에 인함량이 높음. 처리수/총 질소 대비 알카리도와 반응이 최소.	Anoxic조 슬러지 반응, 질산염영향이 제거됨. 5단 Bardenpho보다 저시설비.	Anoxic조 질산염반응이 산소 요구량 및 알카리도 소모량 저감. 호기조 질산염 부하 감소. 인제거 효율영향이 적음.
단점	온도에 민감. A/O 대비 설비와 운전 잡. 운전조건 최적화가 어려움.	내부 순환율이 높아 고비용. A <sub>2</sub> O 대비 반응 조가 크다. 높은 BOD/P필요. 온도영향 불명확. 약품량 불확실.	내부 순환율이 높아 고운전비용. 높은 BOD/P필요. 온도영향 불명확. 약품량 불확실.	내부 순환율이 높아 고비용. 저온시 질소제거능력 저하.

### 2.1.2.1. A<sub>2</sub>O

A<sub>2</sub>O공정은 대표적인 생물학적 질소제거 공정들 중의 하나이다. Fig. 2-1에서 보여주는 A<sub>2</sub>O (Anaerobic, Anoxic, Oxic)공정은 총인 제거용 A/O (Anaerobic, Oxic)공정에 탈질을 위한 무산소조를 추가한 것이다(US EPA, 2010b).

A<sub>2</sub>O공정의 장점은 인과 질소의 제거가 우수하고 인을 제거하기 위한 별도의 무기 응집제 사용이 불필요하다. 그러나 운전조건을 최적화하는 데 어려움이 있고 온도의 영향이 커서 우리나라와 같이 기온의 연교차가 큰 경우는 안정적인 운전이 곤란하다(녹색환경기술, 2005).

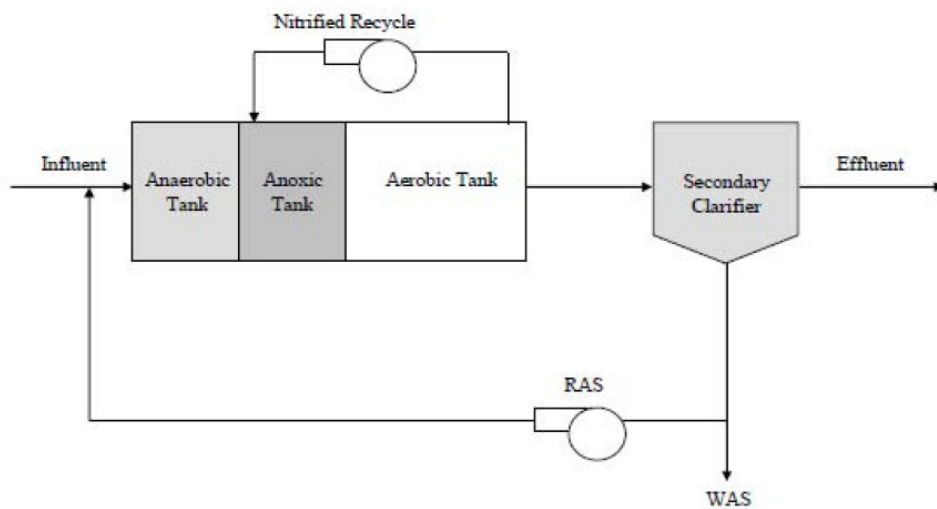


Fig. 2-1. A<sub>2</sub>O process

#### 2.1.2.2. 5단 Bardenpho

5단 Bardenpho 공정은 Fig. 2-2에 보이는 바와 같이 A<sub>2</sub>O공정에 무산소조와 포기조를 하나씩 추가하여 5단으로 변형한 방식이다. 5단 Bardenpho 공정은 슬러지 발생량이 적고 인 함량이 높다는 장점이 있으나 미처리된 질산이온이 침전조에서 혐기조로 반송될 수 있기 때문에 인 방출이 영향을 받을 수 있고 따라서 인의 섭취를 일으킬 수 있는 잠재력을 감소시킨다. 실제로 이 공정은 1mg/L이하의 인을 배출하기는 어려운 것으로 보고되고 있다(US EPA, 2010b).

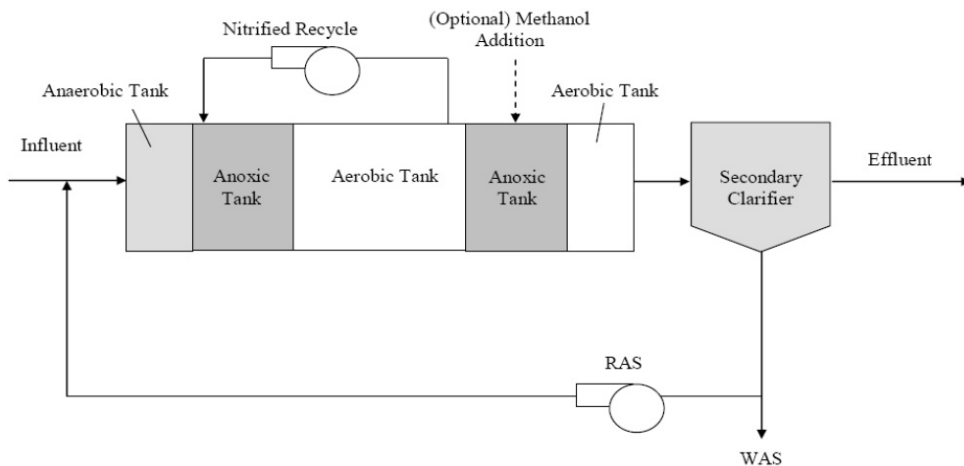


Fig. 2-2. Bardenpho process

#### 2.1.2.3. UCT (University of Cape Town)

UCT공정은 Fig. 2-3에서 보여지는 공정 흐름을 따르며, A<sub>2</sub>O공정과 5단 Bardenpho 공정의 문제점을 개선하기 위해 개발된 것으로 슬러지 반송 지점이 특이하다. 이는 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 이온이 혐기조의 인 방출에 미치는 영향을 최소화하기 위한 것이다.

UCT 공정의 장점은 A<sub>2</sub>O공정보다 효율이 좋지만 내부 순환율의 증가로 운전비가 비싸며 질소의 제거 효율이 떨어지는 것으로 보고되고 있다(US EPA, 2010b).

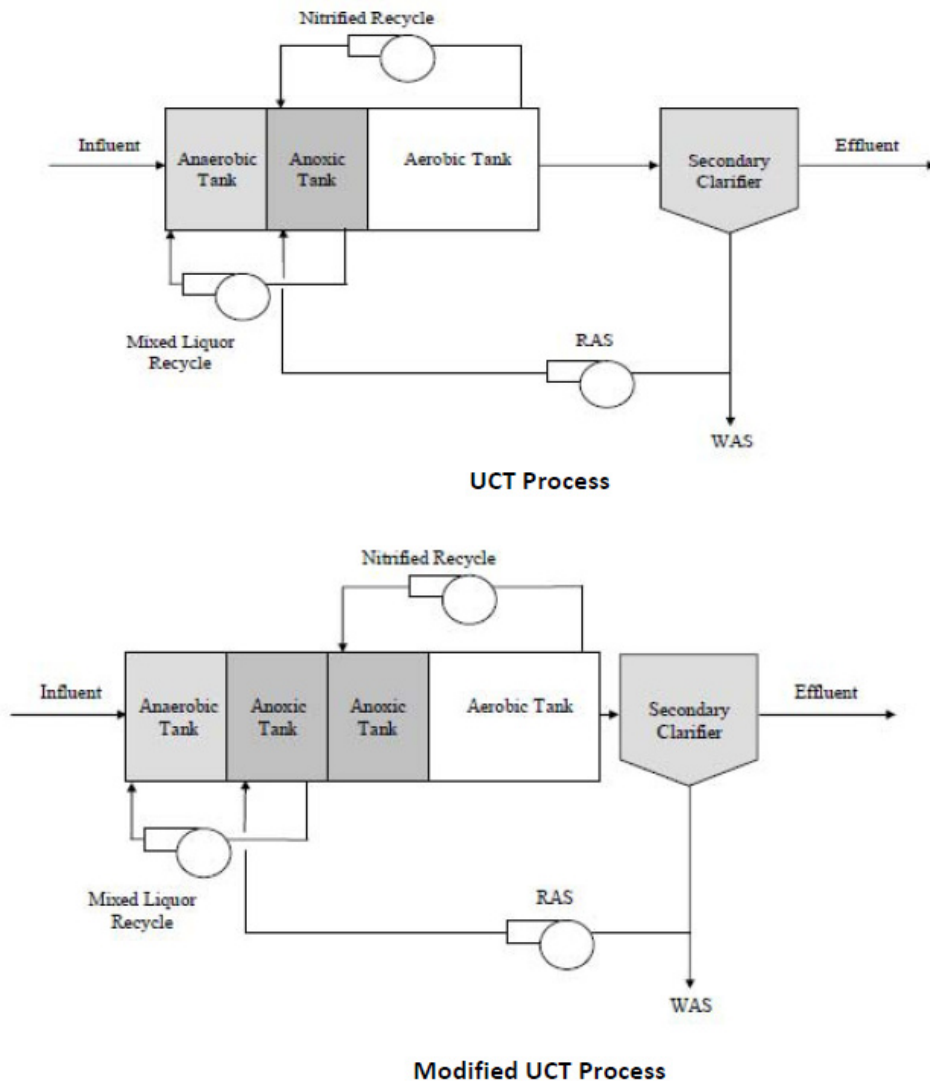


Fig. 2-3. UCT and Modified UCT process

#### 2.1.2.4. VIP (Virginia Initiative Plant)

VIP공정의 기본구조는 UCT와 유사하지만 무산소조와 하나의 포기조가 합쳐진 형식으로 운전상 슬러지의 체류시간을 줄였다.

따라서 이 공정은 미생물의 인 축적량이 늘어나 타 공정에 비해 인 제거 효율이 높고 반응조의 크기가 비교적 작아 부지 면적이 작은 것이 장점이지만 내부순환율이 높아 운전비용이 많이 든다(US EPA, 2010b).

#### 2.1.3. 충전상 생물막 공정

충전상 반응기는 여과 반응기중의 하나로 골재, 슬래그, 세라믹이나 플라스틱류 등의 여재를 충전한 반응기를 말한다. 유체의 흐름과 함께 혐기성 여과반응기와 같이 여재가 채워진 것과 간헐적으로 여재를 투입하는 형식이 있다.

생물학적인 처리의 경우 여재는 생물막을 부착·성장하는 지지대 역할을 하고, 화학적인 흡착의 경우 여재는 흡착반응을 위한 모체역할을 한다. 일반적인 생물막 공정에는 쇄석 등의 여재를 쌓은 여상에 폐수를 살포하는 살수여상 공정과 폐수로 채워진 수조에서 생물막 원판을 회전시키는 회전원판 공정, 특수하게 만들어진 플라스틱이나 입상 활성탄 등 표면적이 큰 여재를 수조에 충전한 침전여상 공정 등이 있다. 이들 공정은 원판이나 여재에 생물막을 증식시켜 폐수 중 유기물질을 생물학적으로 분해한다. 처리하고자 하는 유기물의 종류와 양, 이를 분해하는 미생물의 종류에 따라 산소의 유무, pH, 온도, C/N비 등이 제한인자로 작용한다.

또한 처리하고자하는 유기물질의 종류에 따라 미생물막의 두께



를 일정수준으로 유지하는 것이 중요하다. 호기성 미생물막을 이용하는 경우 생장이 지속되면 일반적으로 알려진 산소 투과깊이 2~3mm를 넘어서는 미생물막 층에는 산소가 투과되지 못해 생물막 내부에 혐기성층이 형성되게 된다.

혐기성층의 미생물 대사에서는 황화수소와 유기산 등이 생성되며 악취가 나게 된다. 또한 호기성층에 증식된 미생물의 일부를 혐기적으로 분해하기도 한다. 이 분해가 진행된다면 생물막은 여재에서 떨어져 새로운 생물막을 형성하기 시작한다. 혐기성층이 현저하게 증대되면 호기적 처리를 방해하는 결과를 가져오므로 생물막의 두께를 알맞게 조절해야 한다.

#### 2.1.3.1. 부유성장

부유성장 방식의 탈질공정에서 미생물은 반응기 내에 부유상태로 유지·교반된다. 반응기의 평균 체류시간(HRT, Hydraulic retention time)은 2~3 시간으로 운전된다.

탈질조 후단에 폭기조가 반드시 필요한데 이는 탈질과정에서 발생하는 질소가스를 탈기하고, 잔류하고 있는 메탄올을 산화시키기 위한 것이다. 질소가스의 방울은 침전지로 유입되기 이전에, 침전지에서 질소가스에 의한 슬러지의 부상을 방지하기 위하여 반드시 제거되어야 한다.

침전된 슬러지의 일정부분은 반응기로 반송되며, 나머지 부분은 적절한 미생물체류시간(SRT, solid retention time)를 유지하기 위하여 폐기된다.

부유성장 방식 탈질 반응기는 탄소원으로 원폐수를 사용하는 경우보다 탈질속도가 빠르기 때문에 반응기가 작고, 과량의 메탄올사용으로 부착성장 방식보다 쉽게 산화된다. 질산화와 탈질이 분리되어 수행되

므로 각 공정의 최적화가 쉽고 고농도의 질소제거가 가능하며 시스템의 조절 및 적용이 간단하다.

반면 분리된 공정의 침전지가 필요하고 질소제거를 위한 단일슬러지 공정과 비교시 단위 공정의 수가 많다.

#### 2.1.3.2. 하향류식 고정상

하향류식 고정상 반응공정(downflow packed-bed systems)은 부착성장 공정의 하나로 물리적으로는 깊이가 깊은 하향류식 사여과지와 같다. 탈질 미생물은 여재에 부착되며, 여재는 성장을 위한 공간으로 제공된다. 메탄올은 여재의 상부에서 주입되며, 질산화된 유입수는 여재를 통과하게 된다.

고정상 반응기는 탈질공정에 적합한데, 그 이유는 생물학적 반응이 발생할 수 있는 충분한 체류시간을 제공하고, 공정에서 공기 중에 노출된 면적이 적어서 탈질에 방해가 되는 산소의 유입을 효과적으로 제한할 수 있기 때문이다.

여재는 굵고, 단단하고, 원형인 고밀도 여재로 구성되어 있다. 이러한 여재는 고형물을 거르고, 탈질 미생물을 저장하는 공간으로 사용된다. 고정상 반응기는 여과나 침전 공정을 생략할 수 있다(US EPA, 2010a).

#### 2.1.3.3. 상향류식 유동상

상향류식 유동상반응기에서 질산화된 2차 처리수는 반응기의 하부로 유입되어 여재를 팽창시킬수 있는 충분한 유량으로 상부로 흐른다. 탈질 미생물들은 모래에 부착되며, 질산화된 유입수가 여재를 통과한다.

일반적으로 소규모 공장에 적용되며 지름 2.4~4.3m, 높이는 다

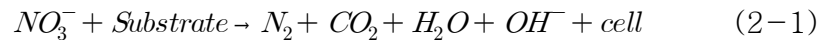
양하게 구성되는 반응기다. 여재층이 팽창하면서 입자가 서로 접촉하지 않기 때문에 여재의 부피 대 표면적의 비율이 매우 높다. 유동상 반응기의 가장 큰 장점은 작은 반응기 크기와 반응기의 수직구조에 따라 높은 미생물 농도에 의한 효율의 증가가 가능하다는 것이다. 생물학적으로 성장가능한 비표면적은 반응기 부피에 따라  $244\sim305\text{ m}^2/\text{m}^3$ 이며 하향류식 고정상 반응기의 비율인  $91\text{ m}^2/\text{m}^3$ 와 비교된다(US EPA, 2010a).

현재까지 유동상 반응기는 한정된 개소에 설치되어 왔으며, 호기성, 무산소, 혐기성으로 적용되었다. 공정은 다양하게 적용되어 왔는데, 주로, 화학처리, 오염된 지하수, 수산물 가공, 도시하수 및 고농도의 산업폐수가 그 예이다. 최근에는 하수처리 보다는 산업폐수처리에 주로 사용되고 있다.

유동상 반응기의 원리는 적용에 관계없이 동일하다. 일정한 원형 여재는 질산화된 유입수가 여재층을 위로 통과할 때 팽창하게 된다. 얇은 활성미생물은 여재의 모든 면에서 형성되며, 이로 인하여 여재가 깨끗한 경우보다 밀도가 감소하게 된다. 밀도가 낮은 입자는 상부로 움직이게 된다. 유동상의 일반적인 특성상 여재층의 막힘 현상이 최소화된다. 매질의 비표면적이 넓고 막힘현상이 없는 경우라면 수리학적 체류시간은 매우 짧아도 된다. 유동상 반응조의 경우 수리학적 체류시간은 10분 이내였다(Rittman et al., 2002).

## 2.2. 탈질 이론 및 제한인자

중속영양탈질반응(heterotrophic denitrification)은 무산소 상태(anaerobic condition)에서 유기 탄소원이 있을 때 중속영양 미생물이 질산성질소를 전자수용체(electron acceptor)로 이용하면서 진행된다. 통상적으로 발효 또는 혐기성반응이라고도 불리는 탈질은 내생호흡조건에서도 일어나지만 그 속도는 매우 느리다.



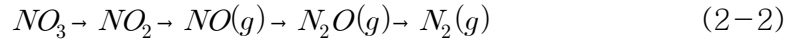
질산성질소는 환원된 후  $N_2$ ,  $N_2O$ ,  $NO$ 와 같은 환원 N형으로 전환되어 최종 처리된다(식 2-1). 탈질반응 중에 탄소원인 유기물의 분해는 호기성과정에서와 마찬가지로다. 열역학 이론에 따르면 무산소 탈질에 비하여 유리탄소의 호기성대사에서 에너지 수량이 큰데, 이는 탈질화 계통에서 무산소상태가 필요함을 나타낸다.

그리고 중속영양 미생물은 1g의 질소에 대하여 COD 3~6 g에 해당하는 탄소를 에너지원으로 요구한다. 이때에 탄소원에 따라 탄소와 질소의 비율은 적절하게 유지되어야 한다. 현재까지는 무산소 조건에서 메탄올이 중속영양미생물에 가장 효율이 좋은 탄소원이라 할 수 있다.

### 2.2.1. 탈질 양론

탈질(Denitrification)을 위한 반응경로에 대한 연구는 다양하게 수행되었는데 일반적으로 알려진 경로는 다음과 같다. 질산 및 아질산을

혐기성 또는 무산소 상태에서 가스상 질소화합물인  $N_2$ ,  $N_2O$ ,  $NO_2$  상태로 전환하여 대기 중으로 방출되는 반응이다(식 2-2).



혐기성 상태와 무산소 상태를 구분하는 이유는 주된 생화학 경로가 혐기성이 아니고 호기성 경로였던 상태를 산소가 없는 상태에서 반응시키기 때문이다. 즉 무산소 조건에서 미생물이 유기물 분해시 산소대신 질산성질소를 전자수용체로 사용하면서 아질산성질소가 질소가스로 변환된다.

미생물 합성을 위해 사용하는 전자공여체는 Fig. 2-4에 나타낸 바와 같이 전자의 일부는 미생물 세포로 전환되고 나머지는 세포로 전환되는 에너지를 공급하기 위해 전자수용체로 전달된다.

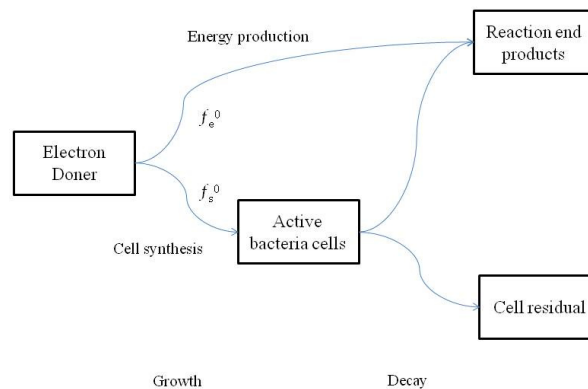
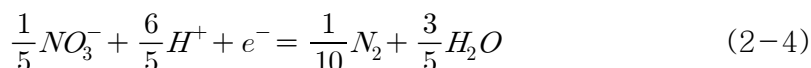


Fig. 2-4. Use of the electron doner for energy production and cell synthesis

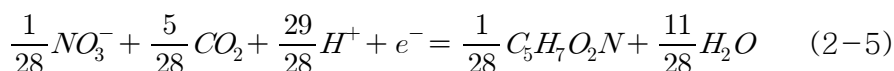
메탄올을 외인성 유기탄소원으로 주입할 때의 반응을 수식으로 표현하면 세포합성시 전자수용체의 반쪽반응식  $R_a$ 와 세포합성 반응식  $R_c$ 는 일정한 비율( $f_e$ ,  $f_s$ )로 합성하게 되고 공여체의 반쪽반응식  $R_d$ 는 산화하기 때문에 빼주게 되면 전체 반응이 식 2-3이 된다. 실규모 탈질 공정에 관한 연구를 기초로 탈질반응을 위한 메탄올은 탈질 미생물합성에 약 26.7%( $f_s = 0.267$ )가 소요되고  $f_e$ ,  $f_s$ 의 합은 1이므로 에너지 생성에는 73.3% 즉  $f_e = 0.733$ 이다(McCarty et al., 1969).

$$R = f_e R_a + f_s R_c - R_d \quad (2-3)$$

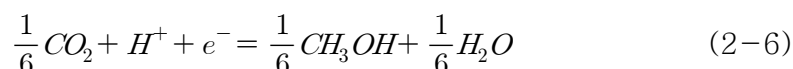
세포합성시 전자수용체 반쪽반응식( $R_a$ )은 2-4이다.



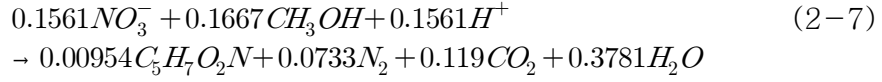
세포합성 반쪽반응식( $R_c$ )은 식 2-5이고



공여체의 반쪽반응식( $R_d$ )은 식 2-6이므로



식 2-4, 5, 6을 각각 식 2-3에 치환하면 식 2-7이다.



식 2-7로부터 질산성질소 2.19g(0.156×14)을 제거하기 위해서는 메탄올 5.334g(0.1667×32)이 필요하고 세포로 1.078g(0.00954×113)을 만들고 질소 2.0524g(0.0733×28)이 가스로 생성됨을 알 수 있다.

식 2-7로부터 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 제거량에 대한 메탄올의 소비량은 식 2-8로 계산된다.

$$\frac{0.1667mol CH_3OH}{0.1561mol NO_3 - N} = 1.0679 \frac{mol CH_3OH}{mol NO_3 - N} \quad (2-8)$$

이를 질량단위로 바꾸면 식 2-9이다.

$$1.0679 \frac{mol CH_3OH}{mol NO_3 - N} \cdot \frac{48g COD}{mol CH_3OH} \cdot \frac{mol NO_3 - N}{14g N} = 3.66 \frac{g COD}{g N} \quad (2-9)$$

따라서 질산성질소 1g/L를 제거하려면 메탄올을 COD환산량으로 3.66g COD/L이 필요하다. 메탄올 1mol은 32g이고 당량분자량은 5.33g/e-eq, 메탄올은 6e-eq/mol 이고 8g OD/e-eq이므로 COD는 48g OD/mol CH<sub>3</sub>OH이다.

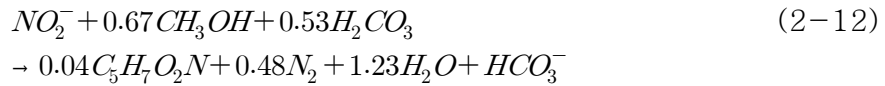
그러므로 1g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/L을 제거하려면 식 2-10에 계산한 바와 같이 이론량으로 메탄올 2.44g이 필요하다.

$$3.66 \frac{g \text{ COD}}{g \text{ NO}_3 - \text{N}} \cdot \frac{1g \text{ NO}_3 - \text{N}}{L} \cdot \frac{g \text{ CH}_3\text{OH}}{1.5g \text{ COD}} = 2.44 \frac{g \text{ CH}_3\text{OH}}{L} \quad (2-10)$$

같은 방법으로 COD당 생성되는 이론적인 건조미생물량(VS)를 계산하면 식 2-11에서 보는 것처럼 1g COD를 소비하고 미생물 0.1347g이 생성된다. 산소 1당량은 O<sub>2</sub> 8g이므로 전자수용체 1당량은 O<sub>2</sub> 8g의 OD에 해당한다. 따라서 1mg MeOH/L는 1.5mg COD/L과 같다.

$$\begin{aligned} \frac{0.00954 \text{ mol } C_5H_7O_2N}{0.1667 \text{ mol } CH_3OH} \cdot \frac{113g \text{ VSS}}{1 \text{ mol } C_5H_7O_2N} \cdot \frac{\text{mol } CH_3OH}{48g \text{ COD}} \\ = 0.1347 \frac{g \text{ VSS}}{g \text{ COD}} \end{aligned} \quad (2-11)$$

또한 아질산성질소(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N)와 메탄올과의 반응식은 식 2-12이고 산소와 메탄올의 반응은 식 2-16이다.



식 2-12로부터 아질산성질소 14g(1×14)을 제거하기 위해서는 메탄올 21.44g(0.67×32)이 필요하고 세포로 4.52g(0.04×113)을 만들고 질소 13.44g(0.48×28)이 가스로 생성됨을 알 수 있다.

양론식으로부터 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 제거량에 대한 메탄올의 소비량은 식 2-13과 같이 계산할 수 있다.



$$\frac{0.67 \text{ mol } CH_3OH}{1 \text{ mol } NO_2 - N} = 0.67 \frac{\text{mol } CH_3OH}{\text{mol } NO_2 - N} \quad (2-13)$$

이를 질량단위로 바꾸면 식 2-14로 표현된다.

$$0.67 \frac{\text{mol } CH_3OH}{\text{mol } NO_2 - N} \cdot \frac{48 \text{ g } COD}{\text{mol } CH_3OH} \cdot \frac{\text{mol } NO_2 - N}{14 \text{ g } N} = 2.297 \frac{\text{g } COD}{\text{g } N} \quad (2-14)$$

따라서 아질산성질소 1g/L를 제거하려면 메탄올 2.297g COD/L이 필요하다. 메탄올 1mol은 32g이고 당량분자량은 5.33g/e-eq, 메탄올은 6e-eq/mol 이고 8g OD/e-eq이므로 COD는 48g OD/mol CH<sub>3</sub>OH이다.

그러므로 1g NO<sub>2</sub>-N/L을 제거하려면 식 2-15에 계산한 것처럼 이론량으로 메탄올 1.53g이 필요하다.

$$2.297 \frac{\text{g } COD}{\text{g } NO_2 - N} \cdot \frac{1 \text{ mg } NO_3 - N}{L} \cdot \frac{\text{g } CH_3OH}{1.5 \text{ g } COD} = 1.53 \frac{\text{mg } CH_3OH}{L} \quad (2-15)$$

또한 산소와 메탄올의 반응은 식 2-16과 같다. 산소 32g(1×32)을 제거하기 위해서는 메탄올 29.76g(0.93×32)이 필요하다는 것을 알 수 있다.



양론식으로부터 O<sub>2</sub> 제거량에 대한 메탄올의 소비량은 식 2-17

과 같이 계산될 수 있다.

$$\frac{0.93 \text{ mol } CH_3OH}{1 \text{ mol } O_2} = 0.93 \frac{\text{mol } CH_3OH}{\text{mol } NO_2 - N} \quad (2-17)$$

이를 질량단위로 바꾸면 식 2-18와 같다. 따라서 산소 1g/L를 제거하려면 메탄올 1.395g COD/L이 필요하다.

$$0.93 \frac{\text{mol } CH_3OH}{\text{mol } O_2} \cdot \frac{48 \text{ g COD}}{\text{mol } CH_3OH} \cdot \frac{\text{mol } O_2}{32 \text{ g } O_2} = 1.395 \frac{\text{g COD}}{\text{g } O_2} \quad (2-18)$$

메탄올 1mol은 32g이고 당량분자량은 5.33g/e-eq, 메탄올은 6e-eq/mol 이고 8g OD/e-eq이므로 COD는 48g OD/mol CH<sub>3</sub>OH이다. 그러므로 1g O<sub>2</sub>/L을 제거하려면 이론량으로 메탄올 0.93g이 필요하다(식 2-19).

$$1.395 \frac{\text{g COD}}{\text{g } O_2} \cdot \frac{1 \text{ g } O_2}{L} \cdot \frac{\text{g } CH_3OH}{1.5 \text{ g COD}} = 0.93 \frac{\text{g } CH_3OH}{L} \quad (2-19)$$

따라서 식 2-10, 15, 19로부터 필요한 메탄올 이론량을 구하면 식 2-20이다.

$$C_m = 2.44N_0 + 1.53N_1 + 0.93D_0 \quad (2-20)$$

그러나 실험규모 공정으로부터 이론식을 개조한 식 2-21 (McCarty, P.

L. et al., 1969)을 따르고 일반적으로 가장 많이 사용하고 있다.

$$C_m = 2.47 N_0 + 1.53 N_1 + 0.87 D_0 \quad (2-21)$$

여기서,  $C_m$  요구 Methanol 농도(mg/L),  $N_0$  최초  $\text{NO}_3^-$ -N 농도(mg/L),  $N_1$  최초  $\text{NO}_2^-$ -N 농도(mg/L),  $D_0$ 는 최초 용존산소 농도(mg/L)다.

### 2.2.2. C/N비

질산화 과정은 호기성 상태이므로 에너지원으로 산소( $\text{O}_2$ )를 이용하지만 탈질은 무산소 상태의 반응이므로 에너지원으로 탄소(C)를 필요로 한다. 따라서 2차 처리를 거친 처리수 또는 빈부하의 폐수를 탈질하고자 할 때는 유기물질이 부족하므로 유기탄소원을 주입해 주어야 한다.

보충 공급원은 발효 처리한 폐수 또는 슬러지 등 "내부적" 공급원이거나 화학물질 등의 "외부적" 또는 "외인성" 공급원일 수 있다. 일반적으로 사용하는 가장 흔한 외인성 유기탄소원은 메탄올이다. 그러나 안전성, 반응속도, 사용성에 관한 문제 때문에 일부 폐수처리공정은 아세트산, 에탄올, 당, 글리세롤 등을 설비의 요구에 따라 대체 외인성 유기탄소원으로 사용하고 있다(DeBarbadillo et al., 2008). 이중 아세테이트에 의한 탈질효율이 가장 높은 것으로 알려져 있으나, 현재로서는 메탄올이 가장 경제적이어서 주로 사용하고 있다(임점호 등, 2006).

탈질시 C/N비는 최소한의 범위를 넘어야 가능하다. 중속영양탈질미생물은 탈질에 필요한 에너지원으로 유기물을 사용하기 때문이다.

C/N비에 대해서는 여러 연구가 수행되어 왔는데 이를 종합해 보면 4.0 이상의 C/N비를 유지할 필요가 있다.

C/N비에 대한 연구는 탈질효율과의 관계를 밝히는 연구 외에도 C/N비가 감소하면 질소제거율이 감소하는 반면, 문제가 되고 있는 온난 화물질인  $N_2O$ 로의 전환율은 증가한다(김동진 등, 2011)는 연구결과도 있다.

식 2-21에서 1g  $NO_3^-$ -N당 2.47g 메탄올로 제시한 바, 이를 COD로 환산하면 1.5배인 3.71g COD다. 따라서 2차처리의 질산화가 완전하게 진행되어  $NO_2^-$ -N,  $O_2$ 가 전혀 없다면 이론적인 최소 C/N비는 3.71이다. Karen(2009)이 MBBRs공정을 대상으로 정리한 Table 2-2를 보면 미국하수처리장에서는 완전한 탈질을 위해 C/N비를 4.4~5.0(g COD/g  $NO_3^-$ -N)으로 메탄올을 투입하고 있는 것으로 조사되었다. 또한 메탄올을 기준으로 하지 않고 폐수를 외인성 유기탄소원으로 사용하는 경우, 제거해야 할  $NO_3^-$ -N g당 4g의 유입 BOD가 필요하다(Tchobanoglous, 2003). C/N비가 이론량 3.71보다 큰 이유는 하수처리장의 공정효율문제와  $NO_2^-$ -N,  $O_2$  등의 간섭에 원인이 있다.

Table 2-2. Comparison of alternative carbon sources in post-denitrifying MBBRs

	Temp	Media fill	Carbon Source	C/N	units	Specific Denit. Rate	units	Reference
Nordre Follo WWTP pilot study	7-10°C	40-50%	Sodium Acetate	4.0	g COD <sub>added</sub> / g $NO_3^-$ -N <sub>eq</sub>	2.2	g $NO_3^-$ -N/m <sup>3</sup> /day	Rusten et al. 1995
Jessheim WWTP batch study	10°C	50%	Methanol	4.6	g COD <sub>used</sub> / g $NO_3^-$ -N <sub>eq</sub> removed	1.4	g $NO_3^-$ -N/m <sup>3</sup> /day	Rusten et al. 1996
			Ethanol	4.3	g COD <sub>used</sub> / g $NO_3^-$ -N <sub>eq</sub> removed	3.0	g $NO_3^-$ -N/m <sup>3</sup> /day	
			Spent Monopropylene glycol (MPG)	5.6	g COD <sub>used</sub> / g $NO_3^-$ -N <sub>eq</sub> removed	1.3	g $NO_3^-$ -N/m <sup>3</sup> /day	
Sjolunda WWTP pilot study	16°C	50%	Methanol	4-5	g COD/ g $NO_3^-$ -N <sub>eq</sub>	2.0	g N/m <sup>3</sup> /day	Aspegren et al. 1998
			Ethanol	4-5	g COD/ g $NO_3^-$ -N <sub>eq</sub>	2.5	g N/m <sup>3</sup> /day	
Sjolunda WWTP	10-20°C	50%	Methanol	4.4	g COD <sub>added</sub> / g $NO_3^-$ -N <sub>removed</sub>	1.1	g $NO_3^-$ -N/m <sup>3</sup> /day	Tailjemark et al. 2004
Klagshamn WWTP	10-20°C	36%	Waste Ethanol	5.4	g COD <sub>added</sub> / g $NO_3^-$ -N <sub>removed</sub>	1.1	g $NO_3^-$ -N/m <sup>3</sup> /day	Tailjemark et al. 2004
Lillehammer WWTP	11-2°C	40-50%	Ethanol	3.4	g COD/ g $NO_3^-$ -N <sub>eq</sub>	3.5	g $NO_3^-$ -N/m <sup>3</sup> /day	Odegaard 2006
Gardemoen WWTP	13-14°C	40-50%	Ethanol	3.8	g COD <sub>added</sub> / g $NO_3^-$ -N	~0.8	g $NO_3^-$ -N/m <sup>3</sup> /day	Rusten & Odegaard 2007
Noman Cole PCP	18.5-20°C	30%	Methanol	5.0	g COD <sub>added</sub> / g $NO_3^-$ -N	2.5-3.0	g $NO_3^-$ -N/m <sup>3</sup> /day	Motsch et al. 2007

Note:  $NO_3^-$ -N<sub>eq</sub> includes  $NO_3^-$ -N equivalents of DO and  $NO_2^-$ -N

### 2.2.3. 온도

미생물을 이용하는 모든 탈질공정은 온도의 영향을 받는다. 온도의 영향에 대한 일반적으로 쓰이는 Arrhenius식은 식 2-22와 같다.

$$r_{D(t)} = r_{D(20)} \times \theta^{T-20} \quad (2-22)$$

여기서  $r_{D(t)}$ 는 탈질효율(g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/g VS · d),  $r_{D(20)}$ 는 20℃에서 탈질효율,  $\theta$ 는 경험적 온도상수, T는 온도(℃)다. 경험적 온도상수  $\theta$ 에 대해 연구결과 값을 Table 2-3에 정리하였다.

식 2-22에 의하면 탈질효율은 5~25℃에서 주로 진행되며 5℃ 이하에서는 급격히 감소하고 온도가 10℃ 상승할 때 대략 2배 정도 증가하게 된다.

Table 2-3. Values for Arrhenius temperature coefficients

Condition	$\theta$	Reference
Anaerobic/Microcosms	1.24	Veraart, A.J., et al., 2011b
Anaerobic	1.28	Nichols, A., et al., 2007
Anaerobic	1.09 – 1.13	Dold, P., et al., 2008
Anaerobic	1.14	Cherchi, C., et al., 2008

식 2-23은 5~30℃의 범위에서 유효하고 3℃에서는 중지되는 조건에서 탈질효율과 온도의 관계를 표현한 식이다(Dawson et al., 1973).

$$r_{D(\max,t)} = 0.07 \cdot 1.06^{(T-20)} \quad (2-23)$$

여기서  $r_{D(t)}$ 는 탈질효율(g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/g MLSS-hr), T는 온도(℃)다.

또한 Strohmeier는 미생물부유공정 실험을 통해 경험적으로 탈질과 온도의 관계를 식 2-24로 나타냈다(Strohmeier et al., 1993).

$$r_{D(\max,t)} = r_{D(\max,15)} e^{K_T(T-15)} \quad (2-24)$$

$r_{D(\max,t)}$ 는 어떤 온도(t)에서 최대 탈질효율(g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/m<sup>3</sup>-d)이고  $r_{D(\max,15)}$ 는 15℃에서 최대 탈질효율(g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/m<sup>3</sup>-d)이며  $K_T$ 는 경험적 온도상수(0.07/℃), T는 온도(℃)다.

DO농도가 같고 수온이 10℃ 차이가 나면 탈질효율은 약 1 kg/m<sup>3</sup>-d 정도의 차이가 난다(Farabegoli et al., 2007). 일반적으로 탈질 반응은 온도가 낮아질수록 효율이 감소하는 반면, 40℃까지는 온도가 증가할수록 탈질 효율도 증가한다고 알려져 있으며, Fig. 2-5에서 볼 수 있듯이, 메탄올을 전자 수용체로 사용하는 탈질 미생물의 경우 수온이 15℃일 때, 20℃에 비하여 70%의 효율을 나타내는 반면, 10℃ 이하로 수온이 떨어지면 효율이 50%로 하락하는 것을 확인할 수 있다(IWA Publishing, 2006).

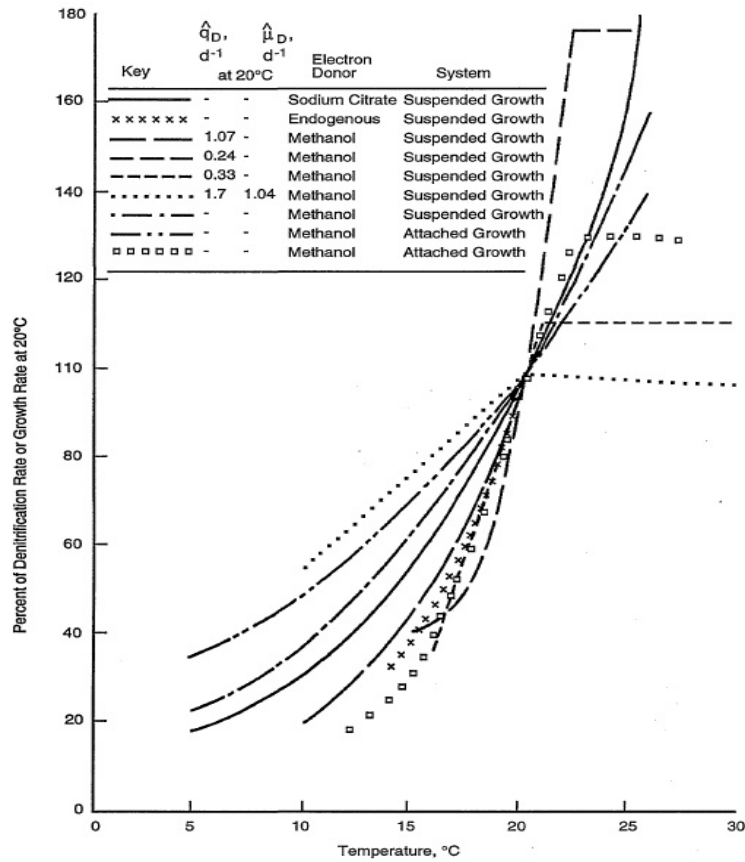


Fig. 2-5. Correlation between denitrification rate and temperature

#### 2.2.4. 용존산소

탈질에서 용존산소는 결정적인 영향을 미친다. 만약 혐기조에 미량의 용존산소가 존재하게 되면 탈질미생물중 약 80%를 차지하는 임의성 종속영양미생물은 NOx와 결합된 산소보다는 수중에 용존된 분자성 산소를 더 선호하기 때문에 탈질을 저해하는 원인이 된다. 탈질미생물은

질산성질소와 산소가 공존하는 경우 최종 전자수용체로 산소를 더 선호한다(IWA, 2006).

탈질속도는 일반적으로 다음 식으로 나타낼 수 있다(김인수, 2001).

$$R_{DN} = K_{DN} \cdot X_v \cdot 1.09^{(T-20)} \cdot (1 - DO) \quad (2-25)$$

여기서  $R_{DN}$ 은 총괄탈질속도이고  $K_{DN}$ 은 탈질속도 상수이고  $X_v$ 는 탈질미생물농도이며  $T$ 는 온도( $^{\circ}\text{C}$ ),  $DO$ 는 용존산소농도다.

혐기성 환경에서의 탈질속도는 미생물 플럭의 무산소 분율과 탄소원의 가용성에 따라 달라진다. 식 2-25에서  $DO$ 항은 용존산소농도가 1.0 mg/L에 접근하면 탈질속도가 0에 접근하는 것으로 해석된다.

미생물학적 접근에 의한 탈질해석을 보면 일반적인 탈질균으로 알려진 *Pseudomonas*는 반응기내부의 용존산소 농도가 0.2mg/L 이상에서는 방해받는다(Dawson, R. N. et al., 1972)고 하기도 하고, *Azospirillum Brasilense*의 탈질효율을 위해 0.5mg/L 이하로 유지할 필요가 있다(박준범, 2004)는 연구결과도 있으며, 일반적인 서적에는 0.5 mg/L 이하 또는 1mg/L 이하로 정의하고 있다.

반면 0.13mg/L 이하가 되면 탈질반응이 중지되었다는 연구결과(Nelson L. M., 1978)와 0.09mg/L 이하가 되면 탈질미생물의 활성을 저해한다는 연구결과(Oh, J. et al., 1999)도 있다. 또한 용존산소의 농도가 0.2mg/L일 때는 용존산소의 농도가 0mg/L일 때에 비해 약 50%정도라는 연구결과(Wheatland, A.B., 1959)도 있었다(Table 2-4).



Table 2-4. Permissible DO concentrations for denitrification

DO and species	Reference
DO<1.0mg/L, Conventional denitrifiers	김인수, 2001
DO<0.5mg/L, <i>Azospirillum Brasilense</i>	박준범, 2004
DO<0.2mg/L, <i>Pseudomonas</i>	Dawson, R. N. et. al., 1972
0.13mg/L<DO, Conventional denitrifiers	Nelson L. M., 1978
0.09mg/L<DO, Conventional denitrifiers	Oh, J. et. al., 1999

연구결과를 요약하면 탈질 용존산소의 농도범위가 0.09~1.0mg/L의 범위 내에 있으나 일치된 정보는 없다. 이는 탈질 미생물이 전자수용체로 산소와 유기탄소원 둘 다를 사용할 수 있는 임의성에서 기인하며, 세세하게는 미생물 종별로도 다른 용존산소 대역에서 활성을 띄는 것으로 보인다. 각각의 미생물이 선호하는 용존산소대역이 미세하게 다르다는 것을 알 수 있다.

## 2.3. 탈질 미생물과 우점도

### 2.3.1. 주요 탈질 미생물

탈질은 질소순환과정의 한 부분이다. 단백질과 핵산의 성분인 질소는 지구에 존재하는 생물에게 필수원소이다. 대기의 79%가 질소기체이며 유기체에 유용하지 않은 형태로 존재하지만 미생물에 의한 일련의 변환을 통해 식물에 유용한 형태로 변하고, 궁극적으로 식물은 모든 동물의 생명을 유지시키는 먹이로 사용된다. 순차적으로 일어나지는 않지만 단계를 분류하면 질소고정, 질소동화, 암모니아화 반응, 질산화 반응, 탈질산화 반응 순으로 일어난다(Fig. 2-6).

질소순환에서와 마찬가지로 하수처리장에서 질소를 처리하는 과정도 질산화과정과 탈질과정으로 구분한다. 질소순환과정에 관여하는 미생물을 Table 2-5에 제시하였다.

다양한 임의성 종속영양 미생물은 탄소원이 있으면 탈질이 가능하다. 임의성이란 미생물이 분자상태의 산소유무와 관계없이 활동하는 것(<http://www.ceric.net>)으로서, 탈질에서는 필요로 하는 산소를 질산성질소로부터 얻을 수도 있고 용존산소로부터도 얻을 수 있는 미생물의 특성을 말한다. 무산소 조건에서 질산기나 아질산기를 전자수용체로 사용하는 임의성 종속영양 미생물들이 여기에 속한다.

이러한 탈질균의 임의성 때문에 질소산화물과 탈질균이 있다 하더라도 필연적으로 탈질이 일어난다고 단정할 수는 없다. 따라서 반응기 내 산소농도는 탈질에 중요한 운전요소(control factor)가 된다.

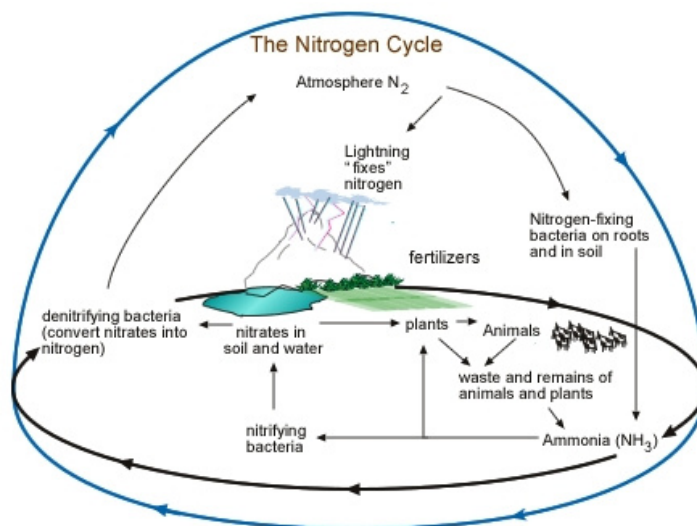


Fig. 2–6. Nitrogen cycle  
<http://telstar.ote.cmu.edu/enviro/m3/s4/cycleNitro.shtml>

Table 2–5. Organisms performing various activities in nitrogen cycle

Nitrification		Proteolysis	Volatilization	
Nitrosification	Nitrification	Ammonification	Anammox	Denitrification
$NH_3 \rightarrow NO_2$	$NO_2 \rightarrow NO_3$	Amino acids $\rightarrow$ ammonia	$NH_3 + NO_2 \rightarrow N_2 + H_2O$	$NO_2, NO_3 \rightarrow N_2$
<i>Nitrosomonas</i>	<i>Nitrospina</i>	<i>Heterotrophs – A</i>	<i>Planctomycetes</i>	<i>Alcaligenes</i>
<i>Nitrosobibrio</i>	<i>Nitrococcus</i>	<i>sp. ergillus flvus</i>	<i>: planctomyces</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Nitrosococcus</i>	<i>rubrum</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Pirellula</i>	<i>Branhamell</i>
<i>Nitrosospira</i>	<i>Nitrobater</i>	<i>sp.</i>	<i>Freshwater – Bro</i>	<i>Corynebacterium</i>
<i>Nitrosolobus</i>	<i>Nitrospira</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>cadia</i>	<i>Flavobacterium</i>
		<i>Bacillus sp.</i>	<i>Marine – Scalindu</i>	<i>Hypomicrobium</i>
		<i>Vivrio sp.</i>	<i>a</i>	<i>Propionibacteria,</i>
				<i>Pseudomonas,</i>
				<i>Rhizobium,</i>
				<i>Rhodopseudmonas</i>
		$NO_2^- \rightarrow NH_4^+$		
		<i>Clostridium sp.</i>		

중속영양 탈질세균은 폐수 처리에 매우 흔하며 *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Hyphomicrobium*, *Moraxella*, *Nesseria*, *Paracoccus*, *Propionibacteria*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Spirillum* 및 *Vibrio* 같은 속(genus)을 포함한다(Tchobanoglous et al., 2003).

16S rRNA gene sequencing, FISH(Fluorescence *in situ* hybridization) 등의 유전자 분석방법을 통하여 분석한 바에 의하면, 메탄올을 전자공여체로 주입하는 경우 *Methylophilales*, *Methyloversatilis*, *Hyphomicrobium*, *Paracoccus* 균이 우점하는 탈질균이고, 아세테이트를 전자공여체로 주입하는 경우는 *Betaproteobacteria*의 *Comamonadaceae*와 *Rhodocyclaceae*가 우점종이다(Timmermans et al., 1983; Van Verseveld et al., 1978; Baytshtok et al., 2008; Baytshtok et al., 2009; Ginige et al., 2004).

최근에는 은 동위원소 추적법을 사용하여 분석한 결과 *Hyphomicrobium zavarzinii* 외에 *Methyloversatilis universalis* 균주를 규명하기도 하였다(Baytshtok, V., 2008). 이러한 결과들로부터 환경 조건에 따라 미생물 군집조성이 달라져 탈질효율에 영향을 주게 됨을 알 수 있다.

또한 탈질화 유동층 반응기 내에서 전자수용체로서 아질산염을 사용하여 암모니아를 질소가스로 산화시키는 능력이 있는 독립영양 박테리아를 발견하였다(Mulder, A., 1995). Table 2-5에 정리한 이런 생물학적 반응을 ANAMMOX(혐기성 암모니아 산화)라고 하며 국내에서도 많은 연구가 진행되고 있다.

탄소를 주입하지 않고 아질산염을 환원시킬 수 있는 *Candidatus Brocadia anammoxidans* 및 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 등의 독립영양미생물이 ANAMMOX 공정에서 발견되는데 이들은 박테리아 도메인의 한 문(Phylum)인 *Planctomycetales* 목(Order)에 속한다. 혐기성 조건에서 아질산염을 환원시켜 암모니아를 산화시킴으로써 질소 가스를 생성한다(Schmidt et al., 2003).

이에 속하는 미생물들은 성장이 느리고, 25° C 이상의 온도에서 반응이 활발해 온도를 일정하게 맞추고 용존산소에 민감해 이를 정확하게 맞춰야 하는 문제점이 있다.

끝으로 탈질미생물은 중속영양미생물뿐만 아니라 독립영양미생물도 존재한다. 독립영양미생물 박테리아들 중 *Paracoccus ferrooxidans*, *Paracoccus denitrificans*, *P. pantotrophus*, 및 *P. versutus* 등은 질산염이나 아질산염을 전자수용체로 사용하여 영가철과 이가철(Fe(II))을 산화시키면서 탈질하는 반응과 *Nitrosomonas eutropha*, *nitrosomonas europaea* 및 *nitrosolobus multififormis*에 의해 황화합물이 환원되면서 탈질하는 반응이 관찰되었다(Kumaraswamy et al., 2006). 무산소 조건에서 *Nitrosomonas*에 의한 암모니아 산화는 느려서(Schmidt et al., 2003) 실용성은 없다(Littleton et al., 2003).

## 2.3.2. 우점도 분석 이론

### 2.3.2.1. 16S rRNA 개념

Carl Woese에 의해 창시된 16S rRNA 유전자 분석은 미생물의 정확한 계통분류를 가능케 하였다. 16S rRNA는 16S 리보솜 RNA라고 불리며 박테리아와 고세균같은 원핵생물 리보솜의 30S 소단위체를 구성하고 있는 rRNA로 1,500 뉴클레오타이드(bp) 정도의 길이를 가지고 있다.

16S rRNA의 서열은 상당히 잘 보존되어 있는 한편 일부 구간에는 염기서열의 다양성이 높아서 미생물간의 인식을 가능하게 한다. 이것은 사람의 지문을 이용하여 개체를 분류·인식 가능한 것과 같은 원리이다.

16S rRNA 유전자가 원핵생물의 계통분류에 효율적인 이유는 동일한 종간에 97%이상의 높은 유사성을 가지고 있고 타종 간에는 97%이하의 낮은 유사성을 가지기 때문이다. 디지털 정보로 구성된 뉴클레오타이드(bp) 서열은 다양한 통계분석을 가능하게 한다. 동종 간에는 동일한 생화학적 특징을 가지는 것이 보통이므로 환경 생물공정 해석에 유용한 분석방법이다.

16S rRNA 유전자에 기반한 분자생물학적 분석방법은 크게 정성분석과 정량분석으로 나눌 수 있는데 가장 완벽한 형태의 정성분석은 클로닝(cloning)과 염기서열분석(sequencing)으로 1,500bp 길이의 유전자를 읽어내어 데이터베이스와 상호 비교를 통해 미생물의 종 정보를 얻는다.

미생물의 세포내에서는 다량의 rRNA가 존재하는데 그 중 16S 및 18S rRNA는 각 미생물 종마다 염기서열이 다르지만 매우 비슷한

구조를 공유하고 있어 이것을 이용하여 미생물 종을 구분할 수 있다. 따라서 설계되는 프루브(probe)에 따라 검출되는 미생물을 결정할 수 있으며 프루브는 적절한 조건하에 목적하는 DNA 또는 RNA에 결합(bind)되지만, 상보적인 서열이 존재하지 않거나 조건이 맞지 않으면 교접(hybridization)은 일어나지 않고 프루브는 세포에서 씻겨진다(Jennifer et al., 2001; Schramm, 2003).

#### 2.3.2.2. 생활성도 관찰

탈질 박테리아에서 아질산성질소를 일산화질소로 환원하는 효소(nitrite reductase)는 대표적으로 두 가지를 들 수 있는데, 하나는 nirS 유전자에 의해 전사된 cytochrome cd1 type nitrite reductase이며, 다른 하나는 nirK 유전자에 의해 전사되고 구리(Cu)를 포함하는 nitrite reductase이다(Glockn et al., 1993). 탈질과 관련된 기능성 유전자로 nirK와 nirS는 많은 연구가 있었다.

유전자의 구성이 다양하기 때문에 다수의 탐침자를 사용하여 정성분석을 시행한다. 탐침자 프라이머는 특정 DNA와 반응하여 발색하는 물질이다. Braker 등이 제시한 탐침자를 Table 2-6에 정리하였다(Braker et al., 1998).

Table 2-6. Primers for live/dead cell staining

Primer	Position	Primer Sequence
nirK1F	526-542	GG(A/C)ATGGT(G/T)CC(C/G)TGGCA
nirK2F	565-581	GC(C/G)(C/A)T(C/G)ATGGT(C/G)CTGCC
nirK3R	898-918	GAACCTTGCCGGT(A/C/G)G(C/T)CCAGAC
nirK4R	942-959	GG(A/G)AT(A/G)A(A/G)CCAGGTTTCC
nirK5R	1023-1040	GCCTCGATCAG(A/G)TT(A/G)TGG
nirS1F	763-780	CCTA(C/T)TGGCCGCC(A/G)CA(A/G)T
nirS2F	855-874	TACCACCC(C/G)GA(A/G)CCGCGCGT
nirS3F	1002-1019	TTCCT(C/G/T)CA(C/T)GACGGCGGC
nirS4F	1317-1336	TTC(A/G)TCAAGAC(C/G)CA(C/T)CCGAA
nirS3R	1002-1019	GCCGCCGTC(A/G)TG(A/C/G)AGGAA
nirS5R	1494-1514	CTTGTTG(A/T)ACTCG(C/G)(C/G)CTGCAC
nirS6R	1638-1653	CGTTGAACTT(A/G)CCGGT

### 2.3.2.3. 중합효소연쇄반응을 이용한 DNA 증폭

중합효소연쇄반응(PCR, polymers chain reaction)은 특정 DNA 부위를 반복 · 합성하여 원하는 DNA 분자를 증폭시키는 방법으로, 아주 적은 양의 DNA를 이용하여 많은 양의 DNA 합성이 가능하다.

DNA시료로부터 원하는 구간의 유전자를 중합효소연쇄반응을 통해 증폭한다. 중합효소연쇄반응은 DNA 또는 RNA의 특정영역을 시험관에서 대량으로 증폭하는 기술로 T-RFLP 분석과 클로닝(clonning)의 첫 번째 과정이다.

중합효소연쇄반응은 크게 3단계로 이루어지는데, 이중가닥(double strand)으로 되어 있는 주형(template)을 준비한 후, 먼저 95℃에서 두 가닥의 DNA를 단일가닥의 DNA로 분리하는 변성(denaturation)을 실시한 다음, 변성된 단일 가닥 DNA(single



stranded DNA)에 프라이머(primer)를 50~65℃에서 결합시키는 아닐링(annealing)을 실시한다. 이때 프라이머는 증폭하고자 하는 DNA와 접하는 부위의 서열과 상호보완적인 올리고 뉴클레오타이드 프라이머(oligo nucleotided primer)를 사용한다. 마지막으로 72~75℃에서 폴리머레이즈(polymerase)가 프라이머로부터 DNA를 합성하는 신장과정(extension 또는 elongation)이 필요하다. 이때 사용되는 폴리머레이즈는 고온에서 번식하는 Taq(thermus aquaticus)와 같은 세균의 DNA 폴리머레이즈를 이용한다. 3단계를 반복적으로 기계를 이용하여 시행함으로써 증폭된다. 이러한 증합과정을 Fig. 2-7에 나타냈다.

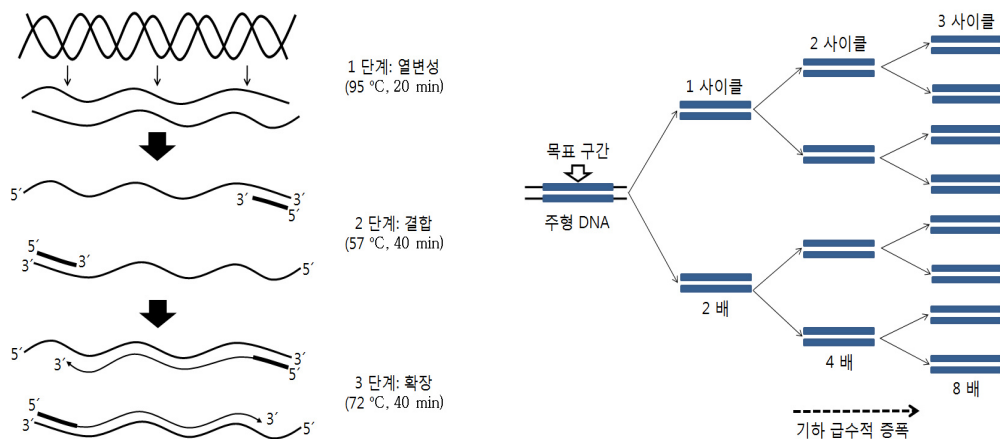


Fig. 2-7. The principle of PCR

이러한 증합효소연쇄반응은 암과 관련된 바이러스(virus)나 패췌췌(pathogen)의 검출, 인간게놈프로젝트(human genome project)에서 염기서열분석이나 유전자지도를 만드는 인간유전자학(human genetics), 멸종된 과거생물의 유전적 구성을 분석하는 진화생물학(evolutionary biology), 친자 감별이나 법의학적 용도인 유전자 핑거프

런팅(genetic fingerprinting) 등에 응용하고 있으나 환경분야에서는 아직 RTQ-PCR을 이용한 탈질 기능성 유전자에 대한 정량분석은 구축된 바가 없고  $^{13}\text{C}$ -DNA를 이용한 고도화된 Stable-Isotope Probing에 대한 연구결과가 있었다(Osaka, 2006).

#### 2.3.2.4. T-RFLP

가장 비용 효율적인 미생물 정성분석은 T-RFLP(terminal restriction fragment length polymorphism)분석이다. 이 방법은 중합효소연쇄반응으로 증폭된 DNA가 제한효소(restriction enzyme)에 의해 절단된 끝단면의 크기를 레이저스캐닝으로 분석하여 미생물의 다양성을 확인하는 방법이다.

T-RFLP는 프라이머에 형광물질을 결합하여 중합효소연쇄반응으로 목표 유전자를 증폭한 후, 제한효소에 의해 절단되어 생성되는 말단 절편 유전자의 다양성을 분석하는 방법이다. 형광물질로 HEX, TET, FAM 등이 사용되며 일반적으로 전방향 프라이머에 결합되나, 미생물군집 분석의 정밀도를 높이기 위해 역방향 프라이머와 동시에 결합하기도 한다. 분석을 통해 도출된 말단 절편의 길이정보는 T-RFLP용 데이터베이스와 비교되고, 환경 시료에 자생하는 미생물을 판별한다(Fig. 2-8).

T-RFLP의 데이터에 영향을 주는 인자는 프라이머의 종류, 제한효소의 종류이다. 사용되는 제한효소는 여러 가지가 있을 수 있으나, *TaqI*, *HaeIII*, *AluI* 등 4 단위의 염기서열을 인식하여 절단하는 제한효소가 자주 사용된다.

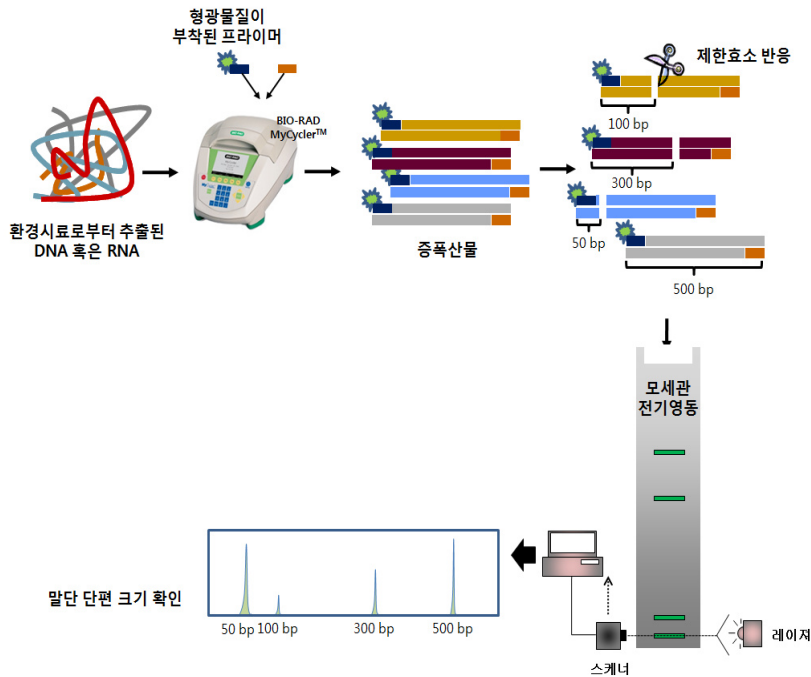


Fig. 2-8. The process of T-RFLP analysis

### 2.3.2.5. 클로닝과 염기서열분석

Fig. 2-9에 클로닝 과정을 그림으로 나타내었다. 먼저 중합효소 연쇄반응을 통해 증폭된 유전자 시료는 다양한 유전자들이 섞인 혼합체이기 때문에 섞인 유전자들을 각각 하나로 분리해야 한다. 이를 DNA 절단이라 하며 절단하는 효소는 디엔에이즈(DNAase)와 제한효소가 있다. 디엔에이즈는 DNA를 무작위로 자르는 효소이고 제한효소는 특정한 염기서열을 인식해서 그 부위만을 잘라낸다.

제한효소에 의해 절단된 DNA 말단은 리게이션(ligation)이라는 과정을 거쳐 연결하는 기술로 클로닝의 두 번째 과정이다. 이 때 사용하는 효소가 리가아제다. 중합효소연쇄반응을 통해 증폭된 시료를 클로닝 벡터(cloning vector)에 삽입하여 합성시킨다. 클로닝벡터는 중합효소연

쇄반응을 통한 증폭산물을 숙주세포인 대장균(*Escherichia coli*) 내부로 운반하는 운반체 역할을 한다. 대장균은 플라스미드 DNA(plasmid DNA)라는 벡터를 가지고 있어서 DNA 클로닝 과정에 주로 이용된다.

리게이션한 DNA를 형질전환을 통해 숙주세포인 대장균 안으로 삽입(insertion)한다. 외래 DNA를 숙주세포가 받아들여 하여 유전자를 변형하는 것이 형질전환이다

형질전환을 통해 대장균안에 들어간 재조합 DNA가 제대로 들어갔는지를 확인하는 것을 선택배지라 한다. 클로닝벡터에는 항생제에 대한 내성 유전자와 베타갈락시다제(*Beta-galactosidase*) 유전자와 접착말단을 가진 외래 유전자가 삽입되어 있다.

베타갈락시다제 발색시약 X-Gal과 외래유전자발현 촉진물질 IPTG를 이용하여 정상적으로 발색한 클로니를 골라내어 항생제 엮피실린이 있는 배지에 배양해서 증폭산물이 정상적으로 포함된 클로닝벡터를 선별·분리한다.

이상의 클로닝과정을 통해 증폭된 16S rRNA 유전자 및 기능성 유전자의 염기서열을 분석하는 것을 염기서열분석이라고 한다. Fig. 2-10에 보인 이 기술은 Sanger에 의해 개발되어 Sanger 방법이라고도 불리며 효소를 이용한 DNA 합성법인 중합효소연쇄반응부터 시작한다.

증폭 시, 디옥시뉴클레오티드(Deoxynucleotide, dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 줄여서 dNTPs)와 디디옥시뉴클레오티드를 동시에 DNA 합성의 재료로 사용하여, 디옥시뉴클레오티드가 사용되면 반응이 계속 진행되고, 디디옥시뉴클레오티드를 만나면 연쇄반응이 종료된다.

이 증폭 산물들을 전기 영동하여 크기가 작은 산물부터 크기가 큰 산물까지 배열한다. 네 가지 디디옥시뉴클레오티드에는 각각 다른 파

장에서 반응하는 형광물질이 부착되어 있다. 각 위치에 있는 형광물질의 반응을 측정하게 되면 이것이 곧 목표 DNA의 염기서열이다.

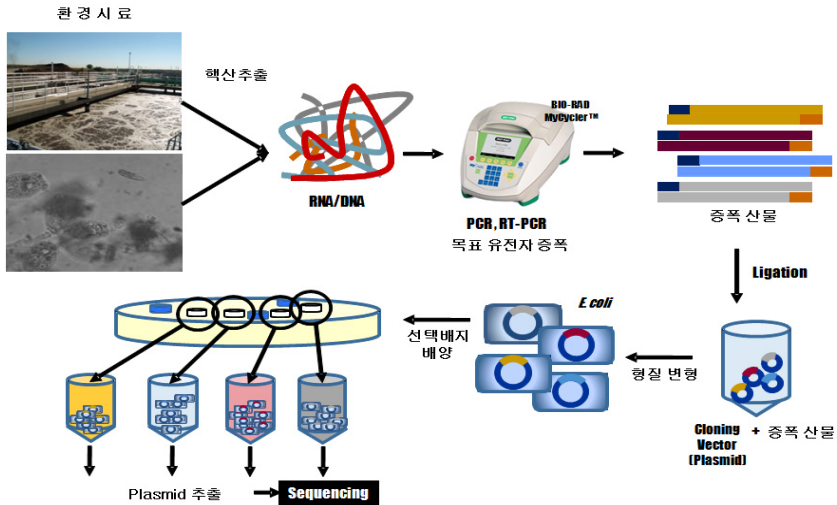


Fig. 2-9. The process of clone library

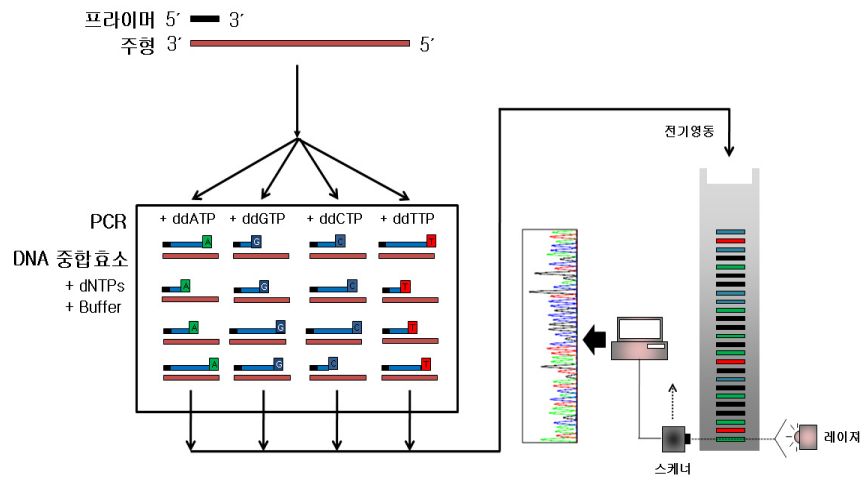


Fig. 2-10. Sequencing by Sanger methods

#### 2.3.2.6. 계통분류학적 분지도 제작

분석된 염기서열(sequencing)을 현재까지 데이터베이스에 저장된 미생물 유전자들 정보와 비교·분석하여 계통분류학적 분지도(phylogenetic tree)를 작성한다. Fig. 2-11은 실제 본 연구에서 제작된 계통분류학적 분지도이다.

염기서열분석과 계통분류학적 분지도 작성은 정밀한 정보를 제공해 주는 장점이 있어 환경 미생물을 중 단계에서 정확히 판단하고자 할 때 널리 쓰이고 있다. 계통분류학적 분지도는 분석 대상 염기서열 정보 내에서 미생물 군집간의 상관관계를 나타내는 지도다.

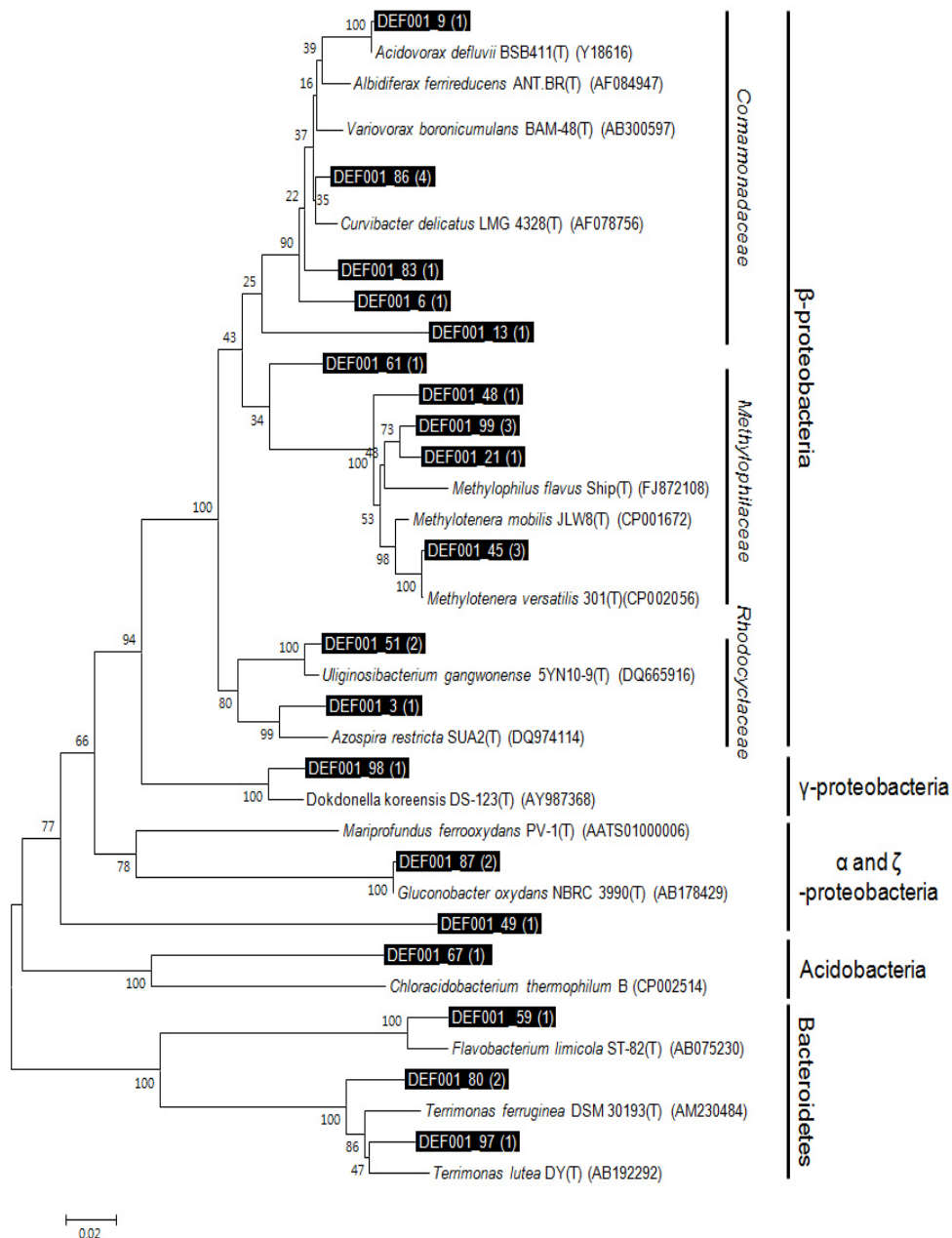


Fig. 2-11. Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences at phase I

### 3. 재료 및 방법

C하수처리장의 면적은  $7,531\text{m}^2$ (약 2,300평)이고 시설 용량은  $9,000\text{m}^3$ 일이다. 유입된 하수 원수는 침사지를 통과하여 큰 입자성 물질을 제거하고 연속회분식반응조(SBR, Sequencing Batch Reactor)에서 생물학적인 방법으로 오염 물질을 제거한다. 그 후 여과 설비(MDF, Micro Disc Filter) 및 자외선 소독을 거쳐 방류한다.

SBR 반응조는 회분식 반응조를 연속적으로 운전할 수 있도록 변형한 것으로 간헐식(intermittent) 반응조 또는 주입 배출(fill and draw)반응조라고 부르기도 한다(Manning, 1985). 오수의 유입이 일정하지 않고 고농도이며 유입 오염물질의 부하변동이 심한 소량의 오수도 잘 처리할 수 있고, 1회 반응시간은 통상 3시간에서 24시간까지 변환 가능하다.

연구를 위하여 동절기와 하절기에 SBR에 대한 방류수 수질 사전조사를 진행하였다(Table 3-1). C 하수처리장은 I 지역에 위치하고 있으며 적용되는 방류수 수질기준은 총질소가  $20\text{ mg/L}$  이하, 총인은  $2\text{ mg/L}$  이하로써 2011년까지의 수질기준을 만족하고 있었다. 그러나 2012년부터 I 지역,  $500\text{m}^3/\text{일}$  이상인 하수처리시설에 대한 동절기 총질소와 총인 방류수 수질 완화기준이 폐지됨에 따라 계절에 관계없이 총질소는  $20\text{ mg/L}$  이하, 총인은  $0.2\text{ mg/L}$  이하를 만족해야 하므로 총질소 및 총인 고도처리 공정이 필요한 시설이다.

동절기에 수온은 평균  $11^\circ\text{C}$  정도이고 총질소는 평균  $10\text{ mg/L}$ , 최고  $15\text{ mg/L}$ 로 방류하고 있다. 하절기에는 수온이 평균  $20^\circ\text{C}$  정도로 유



지되고 총질소는 평균 4 mg/L, 최고 8mg/L 정도로 배출하고 있었다.

Table 3-1. Water quality of the effluent discharged from C sewage treatment plant

	Winter season (Max.)	Summer season (Max.)
Period	2010/12/7 ~ 2011/ 3/ 27	2011/7/17 ~ 2011/10/17
Temp.(℃)	11 (13)	20 (21)
pH	7 (7)	7 (7)
BOD <sub>5</sub> (mg/L)	3 (4)	1 (3)
COD (mg/L)	13 (15)	7 (12)
SS (mg/L)	3 (4)	1 (3)
T-P (mg/L)	1 (2)	1 (1)
T-N (mg/L)	10 (15)	4 (8)

SBR은 중력 침강으로 미생물을 분리하기 때문에 미생물을 고농도로 유지하기가 어렵고, 갑작스러운 부하변동 시에 미생물 유실을 초래하게 되어 우발적으로 처리효율이 나빠질 수 있다. 반면 상향류식 유동상 반응기는 수리학적 체류시간이 훨씬 짧고 작은 규모로도 대용량의 하·폐수를 처리할 수 있기 때문에 SBR과 상호 보완적일 수 있다.



Table 3-2. Specification of the full-scale FBR

Feature	Section	Specification
FBR	Plan flow rate	1,177 m <sup>3</sup> /d (49.0 m <sup>3</sup> /hr)
	Material	FRP
	Size	D 2.7 m × H 5.5 m
	Section area	5.73 m <sup>2</sup>
	Filter height	2 m
	Quantity	2 unit
Air Compressor	Flow rate	1.27 m <sup>3</sup> /min
	Pressure	7.0~9.9 kgf/cm <sup>2</sup>
	Power	7.5 kW
	Quantity	2 unit (spare 1unit)
	Receiver Tank	0.5 m <sup>3</sup>
Influent Tank	Volume	30 m <sup>3</sup>
	Quantity	1 unit
Influent pump	Type	Centrifugal
	Capacity	0.8 m <sup>3</sup> /min (10 mH)
	Power	3.7 kW
	Quantity	4units(spares : 2units)
Chemical pump	Type	Tubing
	Capacity	82 ml/min
	Power	0.05 kW
	Quantity	6 units(spares : 2units)
Chemical tank 1	Type	Poly Ethylene, 원통 입형 탱크
	Capacity	2 m <sup>3</sup>
	Quantity	1 unit
Chemical tank 2	Type	Poly Ethylene
	Capacity	5 m <sup>3</sup>
	Quantity	1 unit
Auto sensor	Flow meter	Green Flowmeter, SSM 100×2
	Nitrate Sensor	HACH, NITRATAx plus sc×1
	DO Sensor	HACH, sc200™ Universal controller×1
	Level sensor	Quick Type Level Sensor, DQL-4F×1

### 3.1.1.2. 여재 재원

내부에 충전한 여재는 비중  $2.65\text{ton/m}^3$ , 겉보기비중  $1.69\text{ton/m}^3$ 인 모래를  $24.55\text{ton}$  사용하였고 공극률 35%, 균등개수 1.29, 알갱이의 크기는  $0.963 \pm 0.09\text{mm}$ , 형상계수는  $1.14 \pm 0.150$ 이고 비표면적은  $3187.1\text{m}^2/\text{m}^3$ 였다(Table 3-3).

Table 3-3. Media Specitication of the full-scale FBR

Media	Specification	Remarks
Seeming gravity ( $\text{ton/m}^3$ )	1.69	
Specific gravity ( $\text{ton/m}^3$ )	2.65	
Containing weight in reactor (ton)	24.55	
Porocity (%)	0.35	
Specific area ( $\text{cm}^2/\text{g}$ )	23	
Uniformity coefficient	1.29	
Particle diameter $d_p$ (mm)	$0.963 \pm 0.09$	
Shape factor ( $\Psi$ )	$1.14 \pm 0.150$	
Media specific area ( $\text{m}^2/\text{m}^3$ )	3886.2	

### 3.1.1.3. 상향류식 유동상반응기의 설치 및 작동원리

실규모 상향류식 유동상반응기는 유입원수로 SBR반응조의 배출수를 사용하였다(Fig. 3-2).

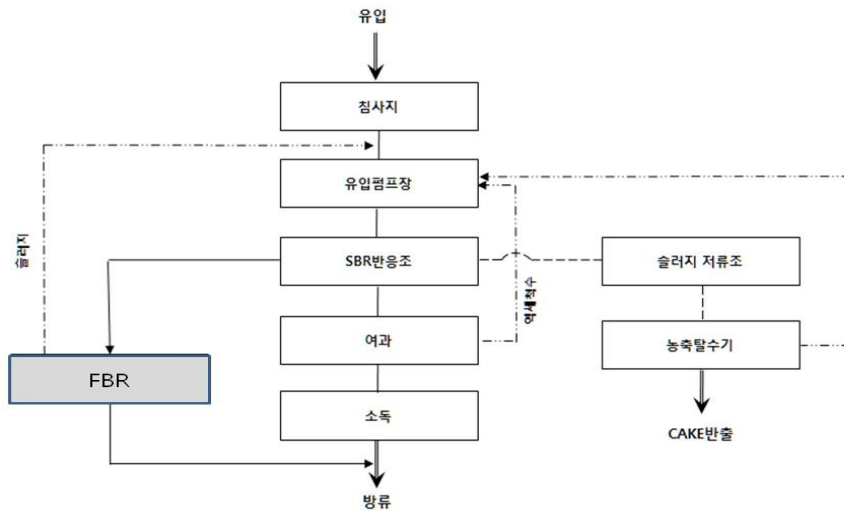


Fig. 3-2. Connected FBR with C sewage treatment plant

Fig 3-3은 용인 C 하수처리장에 설치한 상향류식 유동상반응기이다. 기본적으로 1단 처리 공정으로 운영되나 더 높은 고도처리를 위해 2단 처리 공정 운영이 가능하도록 설치하였다. 유량 조절을 위해 설치된 유입수조 용량은 30 m<sup>3</sup>이다. 오염물질 제거 후 생성된 반류수는 하수처리장 내 유량조정조로 반송되며 상향류식 유동상반응기의 처리수는 별도 추가 공정 없이 방류했고, 인위적으로 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 부하를 높일 때는 슬러지와 같이 유입펌프장으로 배출하였다.



Fig. 3-3. Picture of the full-scale FBR

### 3.1.2. 상향류식 유동상반응기 운전원리

설치한 반응기는 2012년 3월 5일부터 8월 24일까지 183일 동안 시험·운전하였고 초기 미생물 접종은 용인시 C하수처리장의 슬러지를 사용하였다.

본 연구에서 사용한 상향류식 유동상반응기는 하수·메탄올 혼합액 주입부와 오염물질 제거를 위한 여재 충전부, 성장한 미생물을 슬러지로 배출하는 슬러지 분리부로 구성되며 여재재생을 위한 공기압축기와 운영시스템을 갖추었고 이를 Fig. 3-4에 나타내었다.

메탄올이 2차 처리수와 혼합·분산이 잘 되도록 하고 용존산소

를 없애기 위하여 메탄올은 유량조정조에 주입한다. 메탄올이 분산된 2차처리수는 하수·메탄올 혼합액 주입부 (1)로 들어간다.

주입부 (1)로 들어온 메탄올이 분산된 2차 처리수는 배관 (2)를 거쳐 토출부가 있는 분배관 (3)을 통해 반응기 내부로 투입된다. 반응기 내부에서 상향류로 흐르면서 여재층을 거치고 이 과정에서 오염물질을 제거한 후 위어(Weir) (4)를 통해 처리수가 배출된다.

오염물질 제거를 위한 여재 충전부는 반응기의 본체로 여재로 충전되어 있다. 메탄올이 혼합된 2차 처리수가 여재층을 통과하면서 여재의 표면에 성장하고 있는 미생물과 접촉하여 오염물질이 처리된다.

충진된 여재는 지속적으로 순환하면서 유입수와 접촉한다. 여재 충전부의 여재는 표면에 부착된 미생물과 함께 하부 (a)로 이동하고 메탄올과 혼합된 2차 처리수는 상부 (3)으로 이동한다. 이동하는 여재 표면에는 미생물막이 형성되어 있다. 반응기 하층 여재에 부착된 미생물막은 상층의 여재에 부착되어 있는 미생물 막보다 체류시간이 상대적으로 길기 때문에 하층으로 갈수록 미생물개체들이 많고 성숙한 상태이다.

여재의 순환시 여재를 상부로 이송하는 동력은 압축공기다. 외부 공기를 중앙의 관(Air lift) 하부 (b)에 공급하여 중앙관을 통해 공기가 상부 (c)과 (d)가 있는 분리조로 흐르게 한다. 외부공기의 압력으로 여재충진부 하단에서 성숙한 미생물을 부착하고 있는 여재와 하수가 중앙관을 통해 지속적으로 상부의 분리조로 이송된다. 중앙관에 난류를 형성하여 하수와 여재 간, 여재와 여재 간, 압축공기와 여재 간 마찰을 일으켜 여재에 부착되어 있던 미생물이 분리된 상태로 분리조((d), (e) 부분)에 도달하게 한다.

분리조에서는 끌어올려진 하수, 비중이 물보다 작은 슬러지 그리고 비중이 물보다 큰 여재를 분리한다. 슬러지와 분리된 여재는 (d)를

통해 다시 여재 충전부로 재투입되어 반응기의 상층(Sand fill level 위)에 쌓인다. 다시 미생물을 부착하고 성장시키면서 하층 (a)로 이동하게 된다. 분리된 하수는 위어 (e)를 넘어 (f)를 통해 2차 처리수조로 재반송된다.

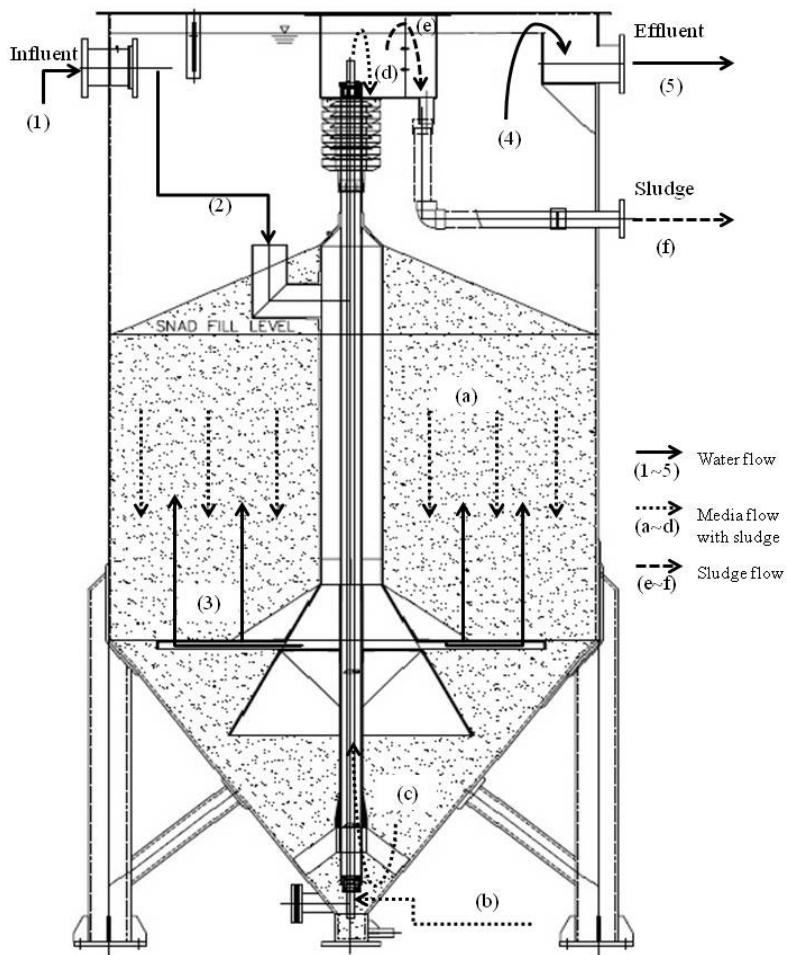


Fig. 3-4. Schematic diagram of FBR



## 3.2. 실험방법

상향류식 유동상반응기에서 질소를 효율적으로 제거하기 위해서는 생물반응기 효율에 절대적인 영향을 미치지만 조정이 불가능한 온도, 탈질효율을 높일 수 있는 운전요소(control factors)인 C/N비 그리고 용존산소를 계절별로 최적화하는 것이 중요하다.

### 3.2.1. 실험단계 분류

운전요소를 최적화하기 위해 분석 시기를 총 3가지 실험단계로 구분하였다. 운영시작부터 80일 동안을 실험단계 I (phase I), 그후 85일 동안을 실험단계 II (phase II) 그리고 그후 8일 동안을 실험단계 III (phase III)으로 구분하여 분석하였다(Table 3-4).

Hallin 등의 연구에 의하면 메탄올을 외인성 유기탄소원으로 주입하면 탈질효율이 첫째날은  $1.2\text{g NO}_3^- - \text{N/g VS} \cdot \text{d}$ 에서 50일째에는  $2.0\text{g NO}_3^- - \text{N/g VS} \cdot \text{d}$ 으로 메틸영양미생물 군집이 충분한 분해효율에 도달하기까지 50~70일에 상당하는 적응 기간이 필요하다(Hallin, S. et al., 1998).

따라서 실험규모 플랜트인데다가 동절기임을 감안하여 본 연구에서는 80일로 분석계획을 수립하였다. 이때 온도범위는  $11.8 \sim 20.1^\circ\text{C}$ 에서 실험단계 I을 다시 온도  $11.8 \sim 15^\circ\text{C}$ 구간과  $15 \sim 20^\circ\text{C}$ 로 분류하여 분석하였다.

Table 3-4. phases based on temperature

phase	Period (days)	Temp.(°C)
I	80	40 11.8~14.2
		40 15.1~20.1
II	85	20.5~27.8
III	8	25.9
Sum	173	11.8~26.8

실험단계 I 은 동절기 운전시기로 온도의 영향을 분석하는 것을 목적으로 하였으며 탈질균을 안정화시킨 시기이다. 실험단계 II는 안정적인 운영기간이며 질산성질소의 유입량을 1.8mg/L로 부터 33mg/L까지 인위적으로 상승시킨 85일 동안이었다.

실험단계 III은 총 8일로 적정한 용존산소의 허용한계를 파악하기 위해 메탄올 투입전 용존산소를 6~8mg/L로 과잉 공급하고, 메탄올 주입시 식 2-21의 산소항에 해당하는 양은 주입하지 않았다.

### 3.2.2. 운전 조건

시험기간 중 유량은 216~552m<sup>3</sup>/d, 반류유량은 72~264m<sup>3</sup>/d, 여재순환(Turnover rate)은 3.45와 3.69 cycle/d로, 수두손실(head loss)은 325.62±67.42mmH<sub>2</sub>O이었다(Fig. 3-5; Fig. 3-6).

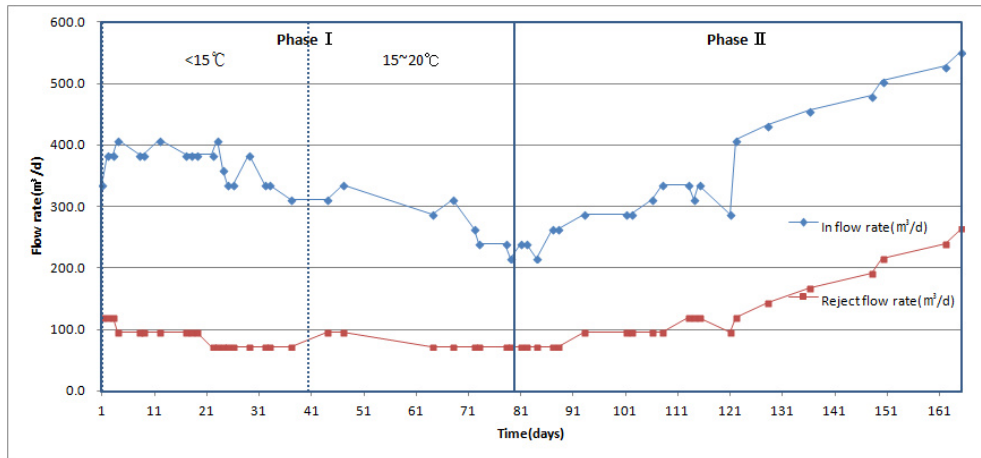


Fig. 3-5. Flow rate of influent waste water in this study

실험단계별로 각각을 구분해 보면 실험단계 I에 유량은 216~408 m³/d, 온도 15°C 이하 기간에는 312~408 m³/d로 유입되었으며, 반류유량은 유입의 25~30% 정도로 조정하였고, 여재는 1일 3.69회 순환, 수두손실은 258.2~387.3mmH₂O였으며 온도 15°C 이하 기간에는 342.3~381.7mmH₂O로 운전하였다.

실험단계 II에 유량은 216~552 m³/d로 유입되었으며, 반류유량은 유입의 25~40% 정도로 조정하였고, 여재는 1일 3.69회 순환시켰고 수두손실은 258.2~387.3mmH₂O으로 운전하였다.

실험단계 III에 유량은 410~440 m³/d로 유입되었으며, 반류유량은 거의 없게 하였고, 여재는 1일 3.69회 순환시켰고 수두손실은 161.3mmH₂O로 운전하였다(Table 3-5).

Table 3-5. Operating condition of the full-scale FBR

Condition	Max.	Min.	phase I (15℃>T)	phase II	phase III
Flow rate (m <sup>3</sup> /d)	552.0	216.0	216~408 (312~408)	216~552	410~430
Reject flow rate (m <sup>3</sup> /d)	264.0	72.0	72~120 (72~120)	72~264	1~7
Turnover rate (Cycle/d)	3.7	3.5	3.69 (3.45)	3.69	3.69
Head loss (mmH <sub>2</sub> O)	387.3	258.2	258.2~387.3 (342.3~381.7)	258.2~387.3	161.3

여재의 순환과 수두손실은 반응기의 막힘과 관련이 있다. 운영이 잘못되어 미생물이 이상 증식하거나 2차 처리수로부터 부유물질(SS)이 과다하게 유입되면 여재충전부가 막히게 된다. 또한 너무 빠르게 순환할 경우 탈질미생물이 충분하게 성장하지 못할 수도 있다.

운영기간 중 수두손실(Head loss)은  $325.62 \pm 67.42 \text{ mmH}_2\text{O}$ 로 운영하였는데 여재 충전부에 미생물이 적절하게 증식하고 있는지, 또 갑자기 많은 양의 부유물질이 유입되었는지를 간접적으로 파악할 수 있는 운전지표다. 수리학적 체류시간은 34.7~88.7min로 운영하였다(Fig. 3-6).

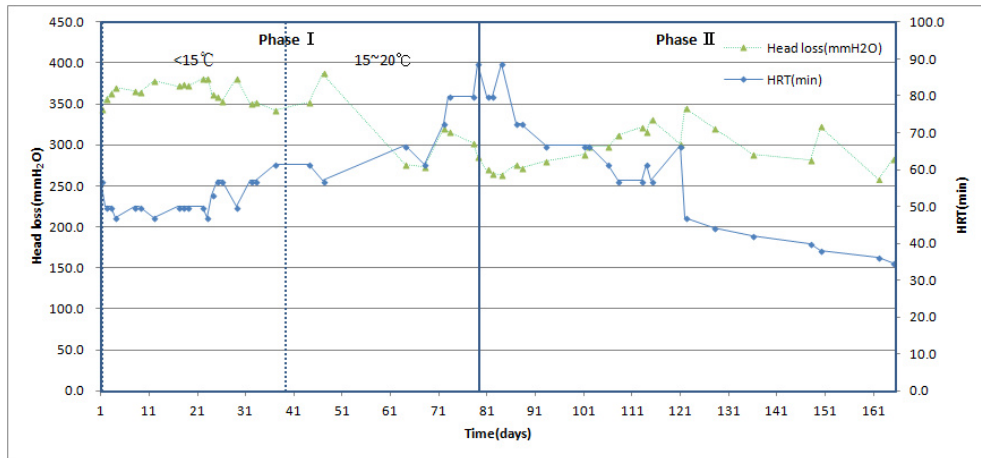


Fig. 3-6. Head loss and HRT of FBR in this study

### 3.3. 분석방법

#### 3.3.1. 제한인자 분석

유기물의 농도는  $\text{COD}_{\text{Mn}}$ 으로 standard methods (APHA, AWWA and WPCF, 1995) 방법으로 분석하였다.

유량은 on-line 자동측정기인 Green Flowmeter SSM100 (SSMI, Korea), 질산성질소는 HACH DR890 (HACH Co, USA) 과 on-line 자동측정기인 NITRATAX plus (HACH Co, USA) 를 사용하여 분석하였다. 용존산소는 HACH 200<sup>TM</sup> Universal Controller (HACH Co, USA) 를 사용하였고 온도(T)는 C하수처리장의 TMS (Telemetry system) 방류수질 자료를 사용하였다.

### 3.3.2. 우점도 분석

분자생물학적 실험은 실험단계 I의 80일 동안 3회, 실험단계 II의 85일 동안 7회, 실험단계 III의 8일 동안 1회씩 시료를 채취하여 분석하였다

우점도분석은 생활성도 평가를 통해 시료채취 위치의 적합성을 평가하였고, T-RFLP 분석으로 유전자분석 대상종의 범위를 확정하였으며 중합효소반응으로 유전자를 증폭하고 OTUs들의 우점도를 산정하였다. 이후 계통분류학적 분지도(Phylogenetic Tree)를 작성한 후, 발견된 탈질 미생물의 계통학적 상관관계와 탈질 미생물의 생화학적 특성을 조사하였다(Table 3-6).

생활성도 평가는 Live/Dead Cell Vitality Assay Kit (Invitrogen, USA)를 사용하여 미생물을 고정하고 광학 및 형광 현미경으로 관찰하였다.

Power Soil<sup>TM</sup> DNA kit (Mo Bio Laboratories Inc., USA)를 사용하여 DNA 추출하였다.

T-RFLP분석은 FAM과 HEX가 각각 결합된 27F (AGAGTTT GATCCTGGCTCAG)와 518R (ATTACCGCGGCTGCTGG)를 프라이머로, 제한효소는 *AluI*과 *TaqI*을 사용하여 2X Multiplex PCR Premix (Solgent Co., Korea)와 MyCycler(BIO-RAD Inc., USA)를 이용하여 였고, 전기영동은 100 mV에서 25분, 정제는 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc., USA)를 사용하였다. Solgent Inc.에 의뢰하여 Laser Scanning을 한 후, GeneScan 소프트웨어(Applied Biosystems Inc., USA)를 이용하여 Peak Pattern을 분석하였다. T-RFLP 분석은 클로닝과 염기서열분석(Cloning and Sequencing)의 범위와 규모를 정

하기 위하여 연구초기에 2회 실시하였다.

중합효소연쇄반응(PCR)에 프라이머로 27 F (5' -AGAGTTT GATC(A/C)TGGCTCAG-3' )와 1492R (5' -GGTTACCTTTGTT ACGACTT-3' )을 사용하였으며 신장은 MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad,US)로 하였다.

분리된 DNA를 pGEM™-TEasy Vector System (Promega, US)을 이용하여 증폭하였고 증폭된 시료를 HIT™ competent cells (Real Biotech Corp.,Taiwan)에 리게이션 혼합물(ligation mixture)을 인입하여 형질을 전환했고 베타갈락시다제 발색시약 X-Gal과 외래유전자발현 촉진물질 IPTG를 이용하여 정상·발색한 클로니를 추출, 항생제 엠피실린이 있는 배지에서 배양하여 클로닝백터를 선별하였다. 선별한 클로닝백터를 플라스미드 추출(Plasmid Extraction) 과정을 거쳐 분리·정제 하였다. 증폭산물은 1,400~1,500 bp로 길이가 다양하였다.

증폭산물을 판별하고 아직은 종이 확인되지 않은 OTUs들의 우점도를 산정하였다. 이후 Mega 프로그램([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net))을 사용하여 계통분류학적 분지도를 작성하였고, 이를 통해 데이터베이스의 기준 미생물(Reference Bacteria)과 실험군에서 발견된 탈질 미생물의 계통학적 상관관계를 확정하였다.

마지막으로 작성된 계통분류학적 분지도를 통해 종 정보를 최종 판별하고 문헌조사를 통하여 탈질 미생물의 생화학적 특성을 조사하였다.

염기서열을 분석 장비는 DYEnamic ET Terminator Sequencing Kit (GEHealthCare, US)와 MegaBACE1000DNA sequencer (GE HealthCare, US)를 사용하였다.

본 연구에서 획득한 염기서열 분석결과를 EzTaxon server

(<http://www.eztaxon.org>) 데이터베이스에 현재까지 저장된 미생물 유전자들과 비교·분석하여 계통분류학적 분지도를 제작하였고, 최종적으로 Mega프로그램([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net))을 이용하여 계통분류학적 분지도를 완성하였다. OTUs (operational taxonomic units)에 대한 계통분류학적 정보 확인은 EzTaxon을 이용하였다.

16S rRNA 유전자 염기서열분석 정보는 Mothur 프로그램 V.1.7.2. ([www.mothur.org](http://www.mothur.org))을 이용하여 배열하였고 각 그룹별로 97% 이상의 상동성을 가지는 OTUs로 분류하여 클러스터링하였다.



Table 3-6. 16S rRNA analysis used in this study

구 분	실험 단계	실험 방법
생활성도 관찰	Live/Dead Cell 현미경 관찰	Live/Dead Cell Vitality Assay Kit(Invitrogen, USA)를 사용하여 미생물을 고정하고 광학 및 형광 현미경으로 관찰
	Genomic DNA 추출	Power Soil™ DNA kit(Mo Bio Laboratories Inc., USA)를 사용하여 DNA 추출
	16S rRNA gene 증폭	16s rRNA gene 분석을 위하여 형광물질이 결합된 프라이머 사용하여 유전자를 증폭 - 형광물질 FAM 결합된 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) - 형광물질 HEX 결합된 518R (ATTACCGCGGCTGCTGG)
	T-RFLP <sup>1)</sup>	형광물질이 결합된 Fragment만 분류하여 관찰하기 위하여 제한효소 <sup>2)</sup> ( <i>Alu I</i> , <i>Taq I</i> )를 사용해 DNA 절단
	T-RFs 관찰	전기영동 <sup>3)</sup> 으로 분리된 각 T-RFs를 QIAquick Gel Extraction kit(QIAGEN Inc., USA)를 이용하여 정제하고 GeneScan 소프트웨어(Applied Biosystems Inc., USA)를 이용하여 생성된 Peak 패턴을 관찰
Clone library 제작 및 Sequencing	Genomic DNA 추출	Power Soil™ DNA kit(Mo Bio Laboratories Inc., USA)를 사용하여 DNA 추출
	16S rRNA gene 증폭	16s rRNA gene 분석을 위하여 프라이머를 사용하여 유전자를 증폭 - 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) - 1492R (TACGGYTACCTTGTACGACTT)
	OTU <sup>4)</sup> 분류	Mothur 프로그램( <a href="http://www.mothur.org">www.mothur.org</a> )을 사용하여 염기서열을 분석, 97% 이상 상동성을 갖는 유전자를 분류
	탈질 미생물 계통 확인	분류된 OTU는 Mega 프로그램( <a href="http://www.megasoftware.net">www.megasoftware.net</a> )과 EzTaxon( <a href="http://www.eztaxon.org">www.eztaxon.org</a> )을 사용하여 계통학적 분지도와 계통분류학적 정보 확보

1) T-RFLP : Terminal Restriction Fragments Length Polymorphism, 여러 시료의 복잡한 DNA를 제한효소로 특정부위를 절단하여 쪼개진 한 단위의 DNA 조각만을 분리해 크기별로 분류함으로써 미생물의 다양성 및 시료간의 미생물 군집구조 연관성 확인을 위해 사용되는 기술임.

2) 제한효소 : 여러 가지 종류의 제한 효소가 존재하며, 각각 일정한 sequence를 갖는 부분만 선택적으로 DNA를 절단함.

3) 전기영동 : 증폭시킨 유전자를 사이즈별로 분리하기 위한 장치

4) OTU : Operational Taxonomic Unit, 보통 97% 이상 상동성을 갖는 유전자를 하나의 OTU로 판단하며 계통분류학적으로 같은 종으로 분류됨.

## 4. 상향류식 유동상반응기에서 제한인자와 탈질효율

### 4.1. 최적 C/N비

용존산소가 무산소이거나 미세산소상태(micro-aerobic)이고 온도가 탈질미생물이 활성화되는 5~10℃ 이상의 상태라면 탈질 미생물에 적당한 외인성 유기탄소원을 제공해야 한다. 반응기마다 미세한 환경차이가 만드는 외인성 유기탄소원의 분산 상태와 미생물과의 접촉면적 및 접촉시간은 탈질효율뿐 아니라 유지비용에도 영향을 미친다.

유입되는  $\text{NO}_3^-$ -N을 기준으로 주입한 COD를  $\text{COD}_{\text{inf}}/\text{NO}_3^-$ - $\text{N}_{\text{inf}}$ 로, 처리된 질산성질소와 이때 소요된 COD를  $\text{COD}_{\text{used}}/\text{NO}_3^-$ - $\text{N}_{\text{removed}}$ 로 COD주입량과 함께 Fig. 4-1에 나타내었다. 실험단계 II부터 COD주입량이 증가하는 것은  $\text{NO}_3^-$ -N을 주입하여 오염부하를 높였기 때문이다. 오염부하를 높임에도 불구하고 두가지의 C/N비가 일치함을 보여준다. 이는 주입된 메탄올이 대부분 탈질에 이용되었음을 의미한다.

Karen Alexandra Bill의 연구에서 유동상 미생물반응기(MBBR, Moving Bed Bio Reactor)에서 메탄올을 탄소원으로 주입할 경우, 10~20℃ 온도조건에서 C/N비는 4.5~5.0( $\text{COD}_{\text{dosed}}/\text{NO}_3^-$ - $\text{N}_{\text{removed}}$ )이고 탈질효율은 1.4~3.0 g  $\text{NO}_3^-$ -N/ $\text{m}^3$ -d였다.

본 상향류식 유동상반응기에서는 온도 20.9~23.3℃에서 C/N비

가  $4.65 (\text{COD}_{\text{dosed}}/\text{NO}_3^- - \text{N}_{\text{removed}})$  일 때  $1.45 \text{ g NO}_3^- - \text{N/g VS} \cdot \text{d}$  였다 (Table 4-1).

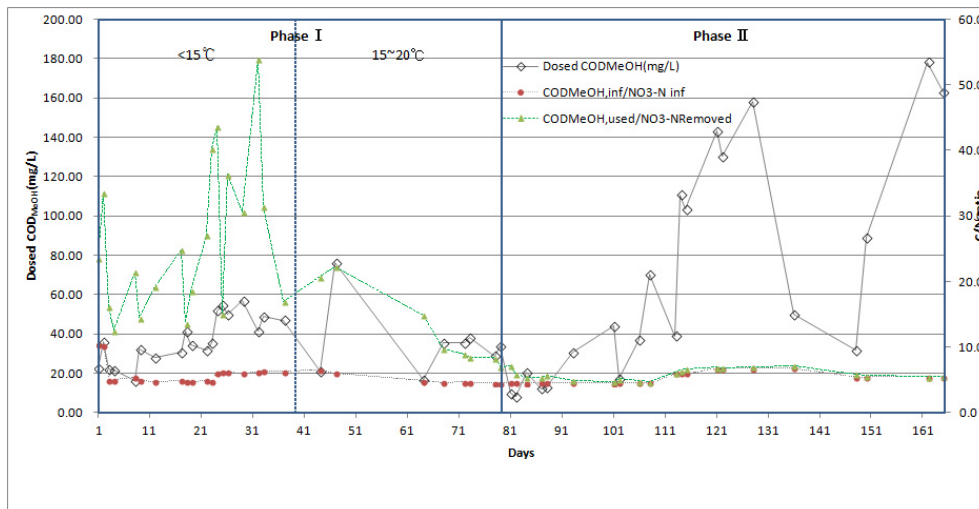


Fig. 4-1. Dosed  $\text{COD}_{\text{MeOH}}$  and C/N ratio of FBR in this study

Table 4-1. C/N ratio and  $\text{SDNR}_{\text{max}}$  on each phase

phase	Temp. ( $^{\circ}\text{C}$ )	C/N ratio ( $\text{COD}_{\text{dosed}}/\text{NO}_3^- - \text{N}_{\text{removed}}$ )	SDNR ( $\text{g NO}_3^- - \text{N/g VS} \cdot \text{d}$ )
I	11.8~15.0	13.59	0.536
	15.4~20.1	7.30	0.922
II	20.5~27.8	4.65	1.446
III	25.9	6.2	0.136

## 4.2. 온도

유입수 온도는 최저 11.8에서 27.8℃로 유입되었다. 수온은 37일(4월 10일)까지도 15℃ 이하를 유지하고 78일(5월21일)까지 20℃ 이하를 유지하고 있다(Table 4-2). Fig. 4-2를 보면 탈질효율은 온도의 함수임을 확인할 수 있다.

Table 4-2. Temperature of influent waste water

Condition	Max.	Min.	phase I (15℃>T)	phase II	phase III
Temp. (℃)	27.8	11.8	11.8~20.1 (11.8~14.2)	20.5~27.8	25.9

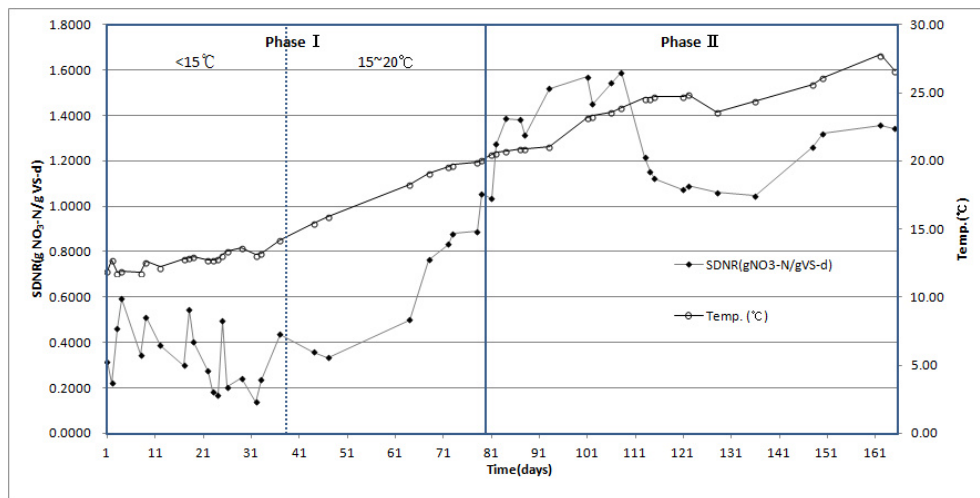


Fig. 4-2. SDNR with temperature of FBR in this study

용존산소가 무산소이거나 미세산소상태(micro-aerobic)이면서

외인성 유기탄소원이 부족하지 않게 공급된다면 탈질은 온도의 함수다.

미세산소상태에서 자료의 비교 조건을 동일하게 하기 위해 식 2-21로 환산한 메탄올 양을 1배수로 주입했을 때의 온도와 탈질효율만을 취하여 회귀분석하였다. 온도는 실험단계 I 에  $15.95 \pm 4.15^{\circ}\text{C}$ , 실험단계 II 에  $24.15 \pm 3.65^{\circ}\text{C}$ 였고 탈질효율은 실험단계 I 과 II 에 각각  $0.6201 \pm 0.4357 \text{ g NO}_3^- - \text{N/g VS} \cdot \text{d}$ 과  $1.3129 \pm 0.2780 \text{ g NO}_3^- - \text{N/g VS} \cdot \text{d}$ 이었다. 회귀분석을 통해 구한식은 식 4-1이고 Fig. 4-3에 나타내었다.

$$SDNR = 0.0743 \times e^{(0.1303 \times T)} \quad (4-1)$$

여기서 SDNR은 탈질효율( $\text{g NO}_3^- - \text{N/g VS} \cdot \text{d}$ ), T는 현재 온도( $^{\circ}\text{C}$ )이고 결정계수  $R^2$ 는 0.8214였다. 식 4-1을 식 2-23의 Arrhenius 형식으로 나타내면

$$r_{D(t)} = r_{D(20)} \times 1.1651^{T-20} + 0.02 \quad (4-2)$$

로 표현할 수 있다. 여기서  $r_{D(t)}$ 는 탈질효율( $\text{g NO}_3^- - \text{N/g VS} \cdot \text{d}$ ),  $r_{D(20)}$ 는  $20^{\circ}\text{C}$ 에서 탈질효율,  $\theta$ 는 경험적 온도상수, T는 온도( $^{\circ}\text{C}$ )이다. 즉 본 연구에서 운영한 실규모 상향류식 유동상 반응기에서는 경험적 온도상수  $\theta$ 는 1.165였다.

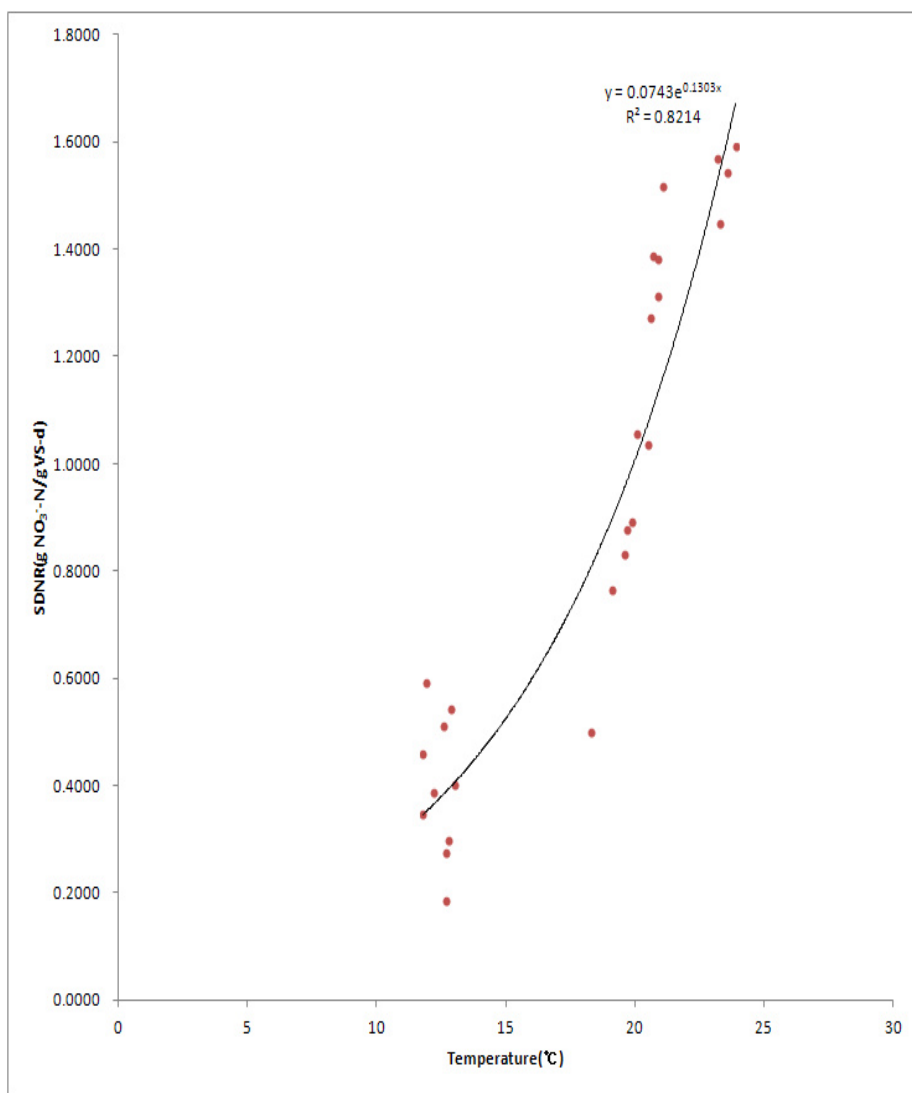


Fig. 4-3. Correlation between temperature and SDNR in the methanol dosed by formula 2-21

### 4.3. 유입 용존산소 상한

메탄올 주입 전 유입수의 용존산소는 4.2~0.9mg/L, 질산성질소는 유입이 1.8~33.0mg/L 유출이 0.1~9.10mg/L였다. 아질산성질소는  $0.02 \pm 0.01$ mg/L로 거의 존재하지 않았다(Fig. 4-4; Fig. 4-5).

유입수의 용존산소는 전단계인 SBR공정을 조정하거나 메탄올을 조기 투입하는 방법 등으로 시험조건을 다양하게 시도하였고, 질산성질소도 시험조건 조정을 위해 인위적으로 주입하기도 하였다.

실험단계별로 각각을 구분해 보면 실험단계 I에 용존산소는 0.8~3.6 mg/L, 온도 15℃ 이하 기간에는 1.4~3.6 mg/L로 유입되었으며, 질산성질소는 1.8~12.6 mg/L로 유입하여 0.1~9.1 mg/L로 배출하였고 온도 15℃ 이하 기간에는 2.2~9.4 mg/L로 유입하여 1.2~7.5 mg/L로 배출하였다. 실험단계 II에 용존산소는 0.8~1.9 mg/L로 유입하였으며, 질산성질소는 1.8~33.0 mg/L로 유입하여 0.1~1.2 mg/L로 배출하였다. 실험단계 III에 용존산소는 6.0~8.0 mg/L로 유입하였으며, 질산성질소는 12.3 mg/L로 유입하여 10.8 mg/L로 배출하였다(Table 4-3).

Table 4-3. DO and  $\text{NO}_3^-$ -N of influent waste water

Condition	Max.	Min.	phase I (15℃>T)	phase II	phase III
Influent DO (mg/L)	4.2	0.9	0.8~3.6 (1.4~3.6)	0.8~1.9	6.0~8.0
Influent $\text{NO}_3^-$ -N (mg/L)	33.0	1.8	1.8~12.6 (2.2~9.4)	1.8~33.0	12.3
Effluent $\text{NO}_3^-$ -N (mg/L)	9.1	0.1	0.1~9.1 (1.2~7.5)	0.1~1.2	10.8

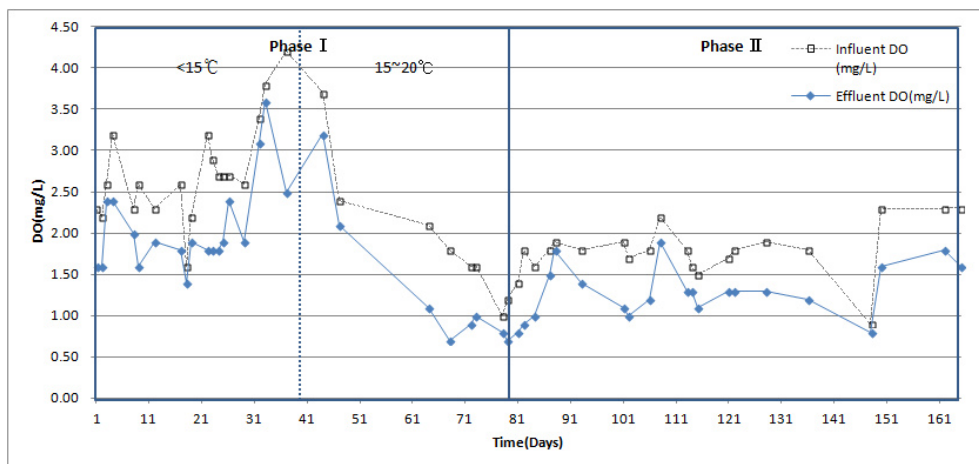


Fig. 4-4. Influent and effluent DO of FBR in this study

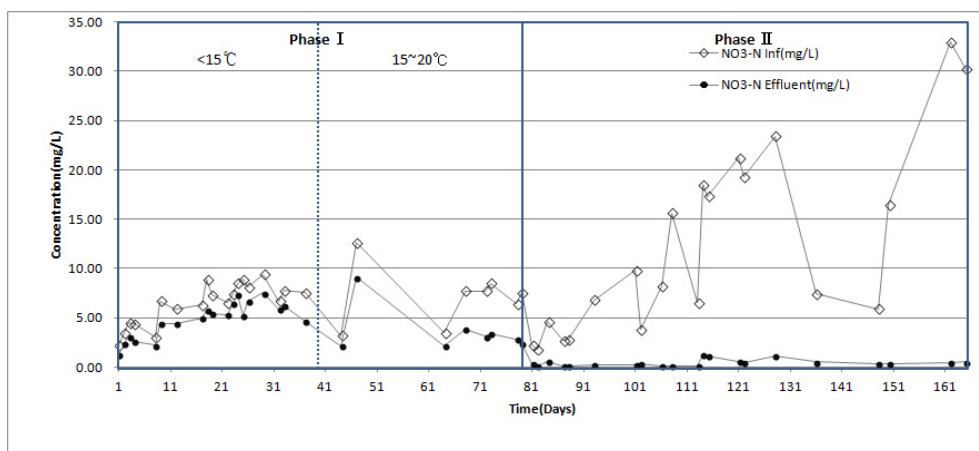


Fig. 4-5. Influent and effluent  $\text{NO}_3^-$ -N of FBR in this study



이전의 연구들에 의하면 용존산소농도는 반응기내에서 0.09~1 mg/L이어야 한다. 그러나 본 연구의 상향류식 유동상반응기는 실규모이고 상향류식 유동상반응기 내에 여재가 충전되어 있어 미생물막 주위의 용존산소를 측정하기 어려웠다. 또한 메탄올의 투입조건을 환산하기 위한 실용적인 목적으로 유입수의 용존산소농도를 측정하였다.

용존산소농도는 메탄올을 주입하기 전 유입수의 용존산소농도 자료다. 유입 용존산소는 실험단계 I 에 0.8~3.6mg/L, 실험단계 II 에 0.8~1.9mg/L였고 탈질효율은 실험단계 I 과 II 에 각각 0.184~1.056 g  $\text{NO}_3^-$ -N/g VS · d과 1.035~1.591 g  $\text{NO}_3^-$ -N/g VS · d였다(Table 4-4).

유입수중 용존산소는 메탄올에 의해 상쇄된 상태로 반응기내에 유입되어 최소한 미세산소상태(Micro aerobic condition)이거나 국지적인 무산소상태가 된 것이기 때문에 탈질반응이 있었을 것이다. 15℃ 이하의 탈질효율인 0.184~0.593g  $\text{NO}_3^-$ -N/g VS · d는 식 4-2의 온도를 고려한 탈질효율식으로 계산한 탈질효율인 0.307~0.435g  $\text{NO}_3^-$ -N/g VS · d과 차이가 있었다.

Table 4-4. DO of influent waste water and SDNR

Condition	Max.	Min.	phase I (15℃>T)	phase II	phase III
Influent DO (mg/L)	3.2	1.0	0.8~3.6 (1.4~3.6)	0.8~1.9	6.0~8.0
SDNR (g $\text{NO}_3^-$ -N/ g VS · d)	1.591	0.184	0.184~1.056 (0.184~0.593)	1.035 ~1.591	0.136
SDNR by form. 4-2	3.334	0.307	0.307~1.042 (0.307~0.435)	1.106 ~3.334	2.499

특정 온도에서 탈질효율은 온도 외에 다른 영향이 없다면 식 4-2로 산출한 값 이상이라고 가정하였다. 탈질효율이 식 4-2의 산출값보다 작다면 온도 외에 용존산소 등의 다른 요인에 의한 탈질저하도 있다고 판단하였다. 또한 상태 II의 탈질효율이 지속적으로 상승하고 있는 것은 용존산소가 안정되었기 때문으로 판단되었다. 따라서 Table 4-5에 제시한 온도대별 C/N비 이상이고 탈질효율이 식 4-2 산출값 이상인 자료들로 용존산소 상한 값을 추출한 결과 온도 15℃ 이하에서 2.7mg/L, 15.4~20.1℃에서 2.2mg/L 였고 20.5~27.8℃에서 1.9mg/L였다. 실험단계 II일 때 탈질효율이 높은 상태를 고려하면 안정적인 탈질을 위한 메탄올 주입전 유입수의 용존산소 상한은 1.9mg/L이다.

Table 4-5. C/N ratio and DO<sub>max</sub> on each phase

phase	Temp. (℃)	C/N ratio (COD <sub>dosed</sub> /NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N <sub>removed</sub> )	Influent DO <sub>max</sub> before COD mixing (mg/L)
I	11.8~14.2	17.75	2.7
	15.1~20.1	14.1	2.2
II	20.5~27.8	4.82	1.9
III	25.9	6.2	8.0

#### 4.4. 결론

본 연구에서 사용한 상향류식 유동상반응기에 대해서 질소를 제거하기 위한 C/N비는 온도 20.9~23.3℃에서 4.65(COD<sub>dosed</sub>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N<sub>removed</sub>)였고 이때의 탈질효율은 1.45 g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/g VS · d였다(Table 4-5). 또한 안정적인 탈질을 위한 메탄올 주입 전 유입수의 용존산소 상한은 1.9mg/L였기 때문에 용존산소를 이 이하로 관리할 필요가 있었다.

온도와 탈질효율간의 상관관계를 분석해서 Arrhenius식으로 표현하면  $r_{D(t)} = r_{D(20)} \times 1.1651^{T-20} + 0.02$ 였다.  $r_{D(t)}$ 는 탈질효율(g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/g VSS-d),  $r_{D(20)}$ 는 20℃에서 탈질효율,  $\theta$ 는 경험적 온도상수, T는 온도(℃)이고 상향류식 유동상반응기에서  $r_{D(20)}$ 는 1.12이고 경험적 온도상수  $\theta$ 는 1.165였다.

$r_{D(20)}$ 를 본 연구의 결과값인 1.12 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/g VSS-d로 하고 비교했을 때,  $\theta$  값은 US EPA의 1.029(US EPA, 2010a)보다는 높았지만 다른 연구결과인 1.09~1.24(Table 2-3)의 사이에 있었다. 상향류식 유동상반응기의 온도와 탈질공정과의 상관관계는 일반적인 탈질공정을 대상으로 US EPA와 Dold, P 등이 제시한 것 보다는 온도에 민감하고 Nicholas의 결과 값보다는 온도에 민감하지 않아 중간 정도의 경향을 나타내었다(Fig. 4-6).

따라서 15℃ 이하일 때는 탈질효율이 평균 0.39 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/g VSS-d, 20℃일 때는 1.12 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/g VSS-d 였으므로 오염물질 유입량이 같다고 가정하면 동절기의 수리학적 체류시간을 약 2.9배 정도로 연장하여 운전하여야 함을 알 수 있었다.

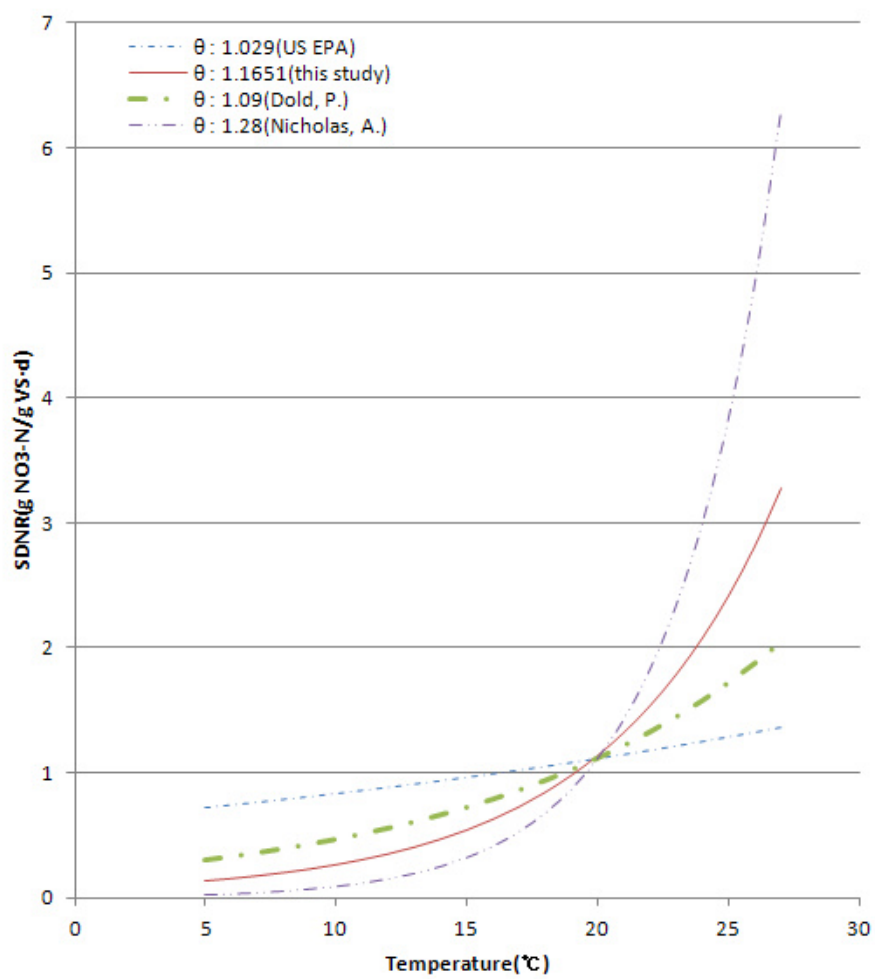


Fig. 4-6. Comparison the temperature correction factor( $\theta$ ) in this study and the others

## 5. 상향류식 유동상반응기에서

### 제한인자와 탈질균

탈질 운전요소인 용존산소와 제한인자인 온도가 변화하면 우점하는 미생물 종이 어떻게 변화하는지 상호 연관관계를 밝혀내는 것이 목적이었다. 이는 복잡한 탈질 메커니즘에서 미생물 증식환경 변화에 따라 메탄올이용 탈질 우점 미생물 군집 내에 존재하는 각각의 종이 어떻게 변화하는 지를 파악하고, 분류함으로써 미생물종을 중심으로 생물학적 탈질효율을 증대시키려는 연구에 중요한 정보를 제공한다.

본 연구에서 획득한 1,437부터 1,514bp까지 29가지 크기의 염기서열을 액세스번호(accession numbers) KF771432~KF771460으로 NCBI database에 등록하였다.

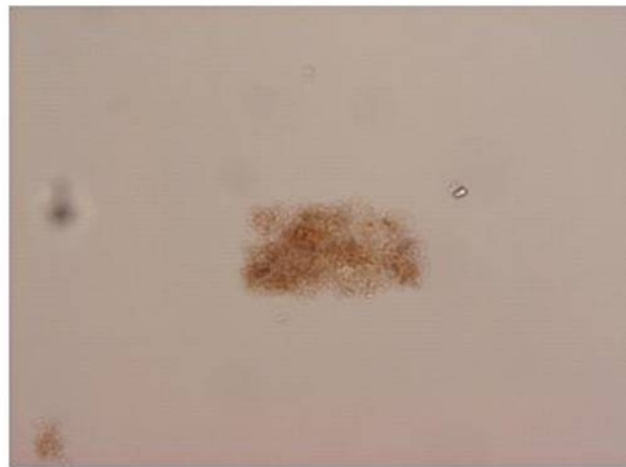
### 5.1. 생활성 평가 및 T-RFLP 분석

#### 5.1.1. 생활성도 평가

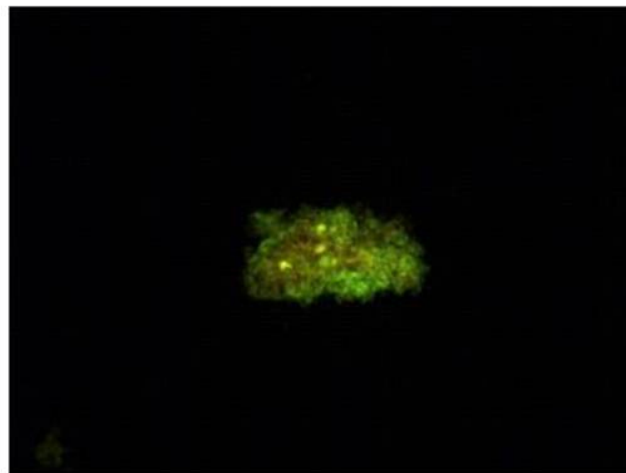
생존한 미생물은 녹색의 형광을 나타내고 세포막의 손상이 있는 미생물은 적색의 형광을 나타낸다.

20  $\mu$ m의 소형 Floc을 대상으로 Live/Dead Cell Staining을 시행한 결과 대부분의 미생물이 녹색 형광을 나타내 활성이 높은 상태임을 확인하였다(Fig. 5-1). 상단의 사진 (a)는 광학현미경 관찰 결과이고

하단의 사진 (b)는 형광현미경 관찰결과다. 결과에 따라서 슬러지 분리조를 미생물채취 위치로 결정하였다.



(a)



(b)

Fig. 5-1. Results of Live/dead cell staining in this study

### 5.1.2. T-RFLP 분석

Fig. 5-2는 27F-FAM 형광물질에 의한 Peak Pattern을 종합한 것으로, 2012년 4월 13일에는 비교적 다양한 군집이 발견되었으며 25, 32/35, 68, 155, 185, 236 bp에 해당하는 T-RFs(Terminal Restriction Fragments)를 관찰할 수 있었다. 2012년 4월 19일에는 다소 미생물 군집이 단순해지는 경향을 나타내고 있으며 35 bp의 우점 현상을 나타내었다.

이러한 결과는 탈질 반응기의 안정화에 의해 미생물 군집이 단순화된 것을 반영한 것일 수 있으나, 탈질 기능을 가진 미생물의 분포가 다양한 것을 고려할 때에 한 가지 미생물이 우점하는 현상은 27F-FAM의 단편적인 결과에 의한 오인일 가능성이 높다. 따라서 미생물 군집 단순화 현상을 재검증하기 위하여 518R-HEX Peak Pattern을 분석하였다.

27F-FAM 말단과 518R-HEX 말단은 염기서열의 구성에 따라 제한효소에 의해 절단되는 양상(Pattern)이 다를 수 있으므로 미생물 군집 단순화현상을 쉽게 단정할 수 없다. 27F-FAM 말단이 원핵생물 중에 따라 잘 보존되어 있다면 단순한 Peak Pattern을 보이고, 변이에 의해 높은 다양성을 보인다면 다양한 Peak Pattern을 보이게 된다. Fig. 5-3 518R-HEX 단편들은 Fig. 5-2 27F-FAM에 비하여 높은 다양성을 나타내었다. 주요하게 나타난 Peak Pattern은 23, 35, 98, 221/225, 247 bp로 최소 6~15종 정도의 미생물이 우점하는 것으로 나타났다.

이러한 정보에 기반하여 클론라이브러리(Clone Library)를 대략 3~5배수로 정의하여 30~50개 정도의 염기서열을 인지하는 것을 목표

로 하여 계통분류학적 분지도(Phylogenetic Tree) 작성을 시도하였다.

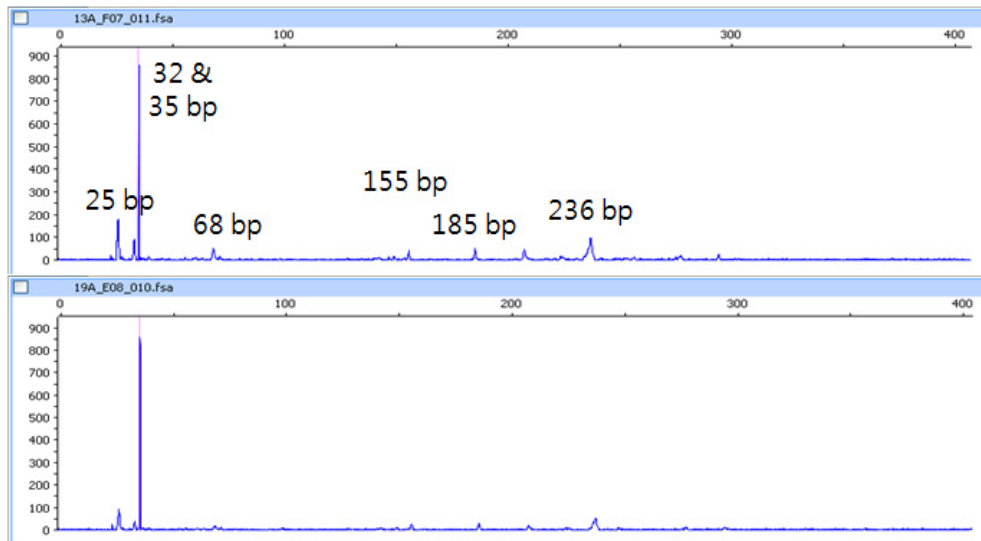


Fig. 5-2. Results of 27F-FAM analysis in this study

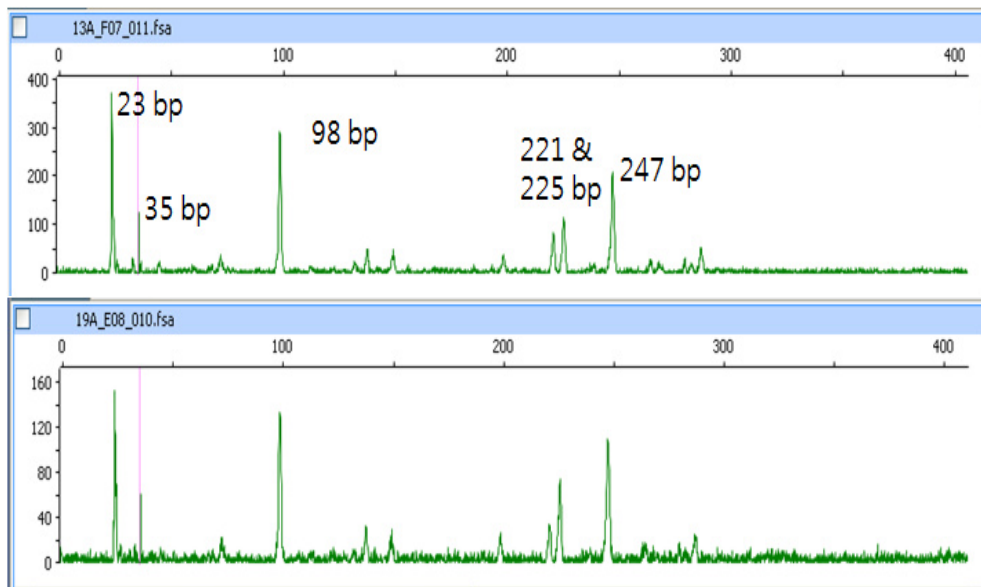


Fig. 5-3. Results of 518R-HEX analysis in this study



## 5.2. 우점도 및 생화학적 특성

미생물의 유전자분석 결과, 우점도에 따라 1% 이하의 아주 작은 우점을 나타내거나 97% 이하의 유사도를 보이는 종은 제외하고 7문(Phylum), 11목(Order), 24 종을 선별하였다. 선별한 미생물은 일반적으로 알려진 탈질미생물과 Methylophilales 그리고 기타 미생물 막을 형성하는 사상균 등으로 구성되어 있었으며 이를 Table 5-1에 정리하였고 분석과정에서 획득한 1,437부터 1,514bp까지 29가지 크기의 염기서열을 액세스번호(accession numbers) KF771432~KF771460으로 NCBI 데이터베이스에 등록하였다.

전체적으로 Proteobacteria가 74.1~81.4%를 차지하여 가장 우점하였으며, Bacteroidetes는 정상적으로 탈질이 진행되는 실험단계 I, II에서 각각 18.6%, 24.1%의 상대적 우점하였으나 실험단계 III에서는 발견되지 않았다.

Proteobacteria내의 하위분류로  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -proteobacteria가 발견되었다. 미생물군집은 실험단계 I 일 때  $\alpha$ -proteobacteria가 5.74%,  $\beta$ -proteobacteria가 74.3%로 우점인 반면, 안정기인 실험단계 II에서는  $\alpha$ -proteobacteria가 32%,  $\beta$ -proteobacteria가 34%로 거의 같은 상대적 우점도를 나타냈다.

$\alpha$ -proteobacteria에는 Rhodospirillales와 Hyphomicrobiaceae가 존재했으며,  $\beta$ -proteobacteria에 속하는 미생물로는 Burkholderiales, Rhodocyclales, Methylophilales 목이 발견되었다.  $\gamma$ -proteobacteria에는 Xanthomonadales,  $\delta$ -proteobacteria에서는 Myxococcales가 발견되었다. Bacteroidetes로는 Flavobacteriales와 Sphingobacteriales, Chloroflexi 문에 속하는 Anaerolineales, Nitrospirae and

Deinococcus-Thermus 목에 속하는 Nitrospirales가 각각 존재하고 있었다.

이중 일반적인 탈질미생물 외에 메탄올을 외인성 유기탄소원에 의하여 선택적으로 적응된 미생물 군집은  $\alpha$ -proteobacteria와  $\beta$ -proteobacteria이며, 그 중에서도 판별된 Burkholderiales, Methylophilales 목이 탈질과 직접적인 상관관계를 가지고 있었다.

특히 Methylophilales는 전체 군집의 11.8~34.3%를 차지하고 있는 가장 우점도가 높은 목(Order)이었고, 이 중에는 *Methylostenella versatilis*, *Methylostenella mobilis*, *Methylobacillus glycogenes* 와 *Methylophilus flavus*로 종을 구성하고 있다.

Table 5–1. Phylogenetic information of OTUs

Order level (Phylum)	Species & Strain Name (OTU)	Size	ID	Access No.	Relative abund. (%)		
					phase I	phase II	phase III
Rhodospirillales ( $\alpha$ -proteobacteria)	<i>Gluconobacter oxydans</i> NBRC3990(T)	1445	DEF001_87, 75	AB178429	5.74	-	-
Hyphomicrobiaceae ( $\alpha$ -proteobacteria)	<i>Hyphomicrobium facile</i> subsp. <i>Facile</i> IFAMH-526(T)	1447	DEN11_10	Y14309	-	32.02	8.30
$\alpha$ -proteobacteria sum					5.74	32.02	8.30
Burkholderiales ( $\beta$ -proteobacteria)	<i>Curvibacter delicatus</i> LMG4328(T)	1484	DEF001_6	AF078756	18.57	1.78	25.00
	<i>Acidovorax defluvii</i> BSB411(T)	1494	DEF001_9	Y18616	1.41	-	8.30
	<i>Albidiferax ferrireducens</i> ANT.BR(T)	1492	DEF001_83	AF084947	1.41	-	-
	<i>Variovorax boronicumulans</i> BAM-48(T)	1496	DEF001_61	AB300597	1.41	-	-
	<i>Azonexus fungiphilus</i> BS5-8	1500	DEN9-13	AF011350	-	20.46	16.70
	sum				22.80	22.25	50.00
Rhodocyclales ( $\beta$ -proteobacteria)	<i>Ferribacterium limneticum</i> cda-1(T)	1496	DEF001_7	Y17060	4.28	-	-
	<i>Uliginosibacterium gangwonense</i> 5YN10-9(T)	1482	DEF001_51, 31	DQ665916	8.60	-	-
	<i>Azospirarestricta</i> SUA2(T)	1501	DEF001_3	DQ974114	4.28	-	-
	sum				17.16	-	-
Methylophilales ( $\beta$ -proteobacteria)	<i>Methylotenera versatilis</i> 301(T)	1499	DEF001_93, 45, 22	CP002056	5.74	-	-
	<i>Methylotenera mobilis</i> JLW8(T)	1500	DEF001_79, 99, 12	CP001672	22.89	9.48	-
	<i>Methylobacillus glycogenes</i> DSM5685(T)	1501	DEF001_25	FR733701	1.41	-	-
	<i>Methylophilus flavus</i> Ship(T)	1501	DEF001_21	FJ872108	4.28	2.32	-
	sum				34.32	11.80	-
Xanthomonadales ( $\gamma$ -proteobacteria)	<i>Dokdonella koreensis</i> DS-123(T)	1514	DEF001_98	AY987368	1.41	3.09	-
Myxococcales ( $\delta$ -proteobacteria)	<i>Chondromyces apiculatus</i> Cma14	1512	DEN12_13	AJ233938	-	4.93	16.70
	<i>Cystobacter velatus</i> DSM14718(T)	1518	DEN12_3	DQ768115			
	<i>Haliangium tepidum</i> SMP-10(T)	1428	DEN11_12	AB062751			
Flavobacteriales (Bacteroidetes)	<i>Flavobacterium limicola</i> ST-82(T)	1475	DEF001_59	AB075230	4.28	-	-
Sphingobacteriales (Bacteroidetes)	<i>Terrimonas ferruginea</i> DSM30193(T)	1492	DEF001_80, 5	AM23048 4	10.02	3.29	-
	<i>Terrimonas lutea</i> DY(T)	1492	DEF001_97	AB192292	4.28	1.93	-
	<i>Candidatus Aquirestis calcephila</i> MS-Falk1-L	1478	DEN5_11,DEN 11_6,DEN3_2	AJ786341	-	18.88	-
Bacteroidetes sum					18.58	24.10	-
Anaerolineales (chloroflexi)	<i>Levilinea. Levilineas accharolytica</i> KIBI-1	1475	DEN12_7	AB109439	-	1.82	8.30
Nitrospirales (Nitrospirae and Deinococcus-Therm us)	<i>Nitrospira defluvii</i>	1500	DEN12_12, 12_5(2)	DQ059545	-	-	16.70

### 5.2.1. 실험단계별 우점도

#### 5.2.1.1. 실험단계 I

Proteobacteria내 미생물군집은  $\alpha$ -proteobacteria가 5.74%,  $\beta$ -proteobacteria가 74.3%로 우점을 보이고 있다(Table 5-2; Fig. 5-4).

$\alpha$ -proteobacteria에는 Rhodospirillales가 5.7%,  $\beta$ -proteobacteria에 속하는 Burkholderiales 22.8%, Rhodocyclales 17.2%, Methylophilales 34.3%로 Methylophilales는 전체적으로 가장 높은 우점도를 보이고 있었다. 또한 Xanthomonadales 1.4%, Bacterioidetes 18.6%중 Flavobacteriales 4.3%, Sphingobacteriales 14.3%로 분석되었다.

$\beta$ -proteobacteria를 보면 Burkholderiales 중에는 *Curvibacter delicatus*가 18.57%로 우점중이고, Rhodocyclales 중에는 *Uliginobacterium gangwonense*가 8.6%이고, Methylophilales 중에는 *Methylostenella mobilis*가 22.9%로 우점하면서 전체 종중에서도 가장 우점하고 있음을 알 수 있다.

Bacterioidetes중에는 Sphingobacteriales에서 *Terrimonas ferruginea*가 10.0%를 점하고 있었다.

Table 5–2. Bacterial community structure of the methylotrophic denitrification consortium in phase I

Phylum	Order	Relative abund. (%)
$\alpha$ –proteobacteria	Rhodospirillales	5.74
$\beta$ –proteobacteria	Burkholderiales	22.80
	Rhodocyclales	17.16
	Methylophilales	34.32
$\gamma$ –proteobacteria	Xanthomonadales	1.41
Bacteroidetes	Flavobacteriales	4.28
	Sphingobacteriales	14.30

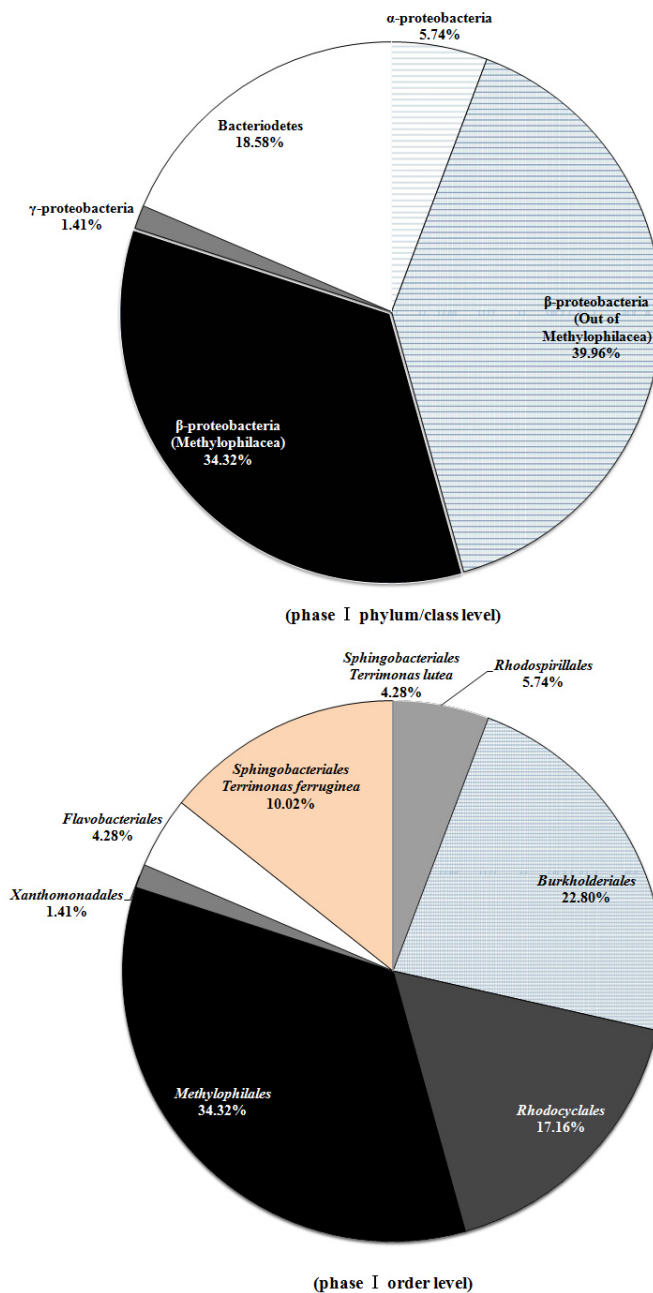


Fig. 5-4. Bacterial community structure of the methylotrophic denitrification consortium on phylum/class levels and order level in phase I

#### 5.2.1.2. 실험단계 II

Proteobacteria내 미생물군집은  $\alpha$ -proteobacteria가 32.0%,  $\beta$ -proteobacteria가 34.0%로 우점을 보이고 있음을 알 수 있다 (Table 5-3; Fig. 5-5).

$\alpha$ -proteobacteria에는 Hyphomicrobiaceae가 32.0%로 전체적으로 가장 높은 우점도를 보이고 있다.  $\beta$ -proteobacteria에 속하는 Burkholderiales 22.3%, Methylophilales 11.8%였다. 또한 Xanthomonadales 3.1%, Myxococcales 4.9%, Bacterioidetes는 Sphingobacteriales가 24.1%로 분석되었다.

$\alpha$ -proteobacteria내 *Hyphomicrobium facile* subsp. *Facile*은 32.0%로 전체 중중 가장 우점하는 종이었고,  $\beta$ -proteobacteria를 보면 Burkholderiales중에 *Azonexus fungiphilus* 종이 20.5%, Methylophilales중에는 *Methylothermobacter mobilis*가 9.5%로 우점하고 있음을 알 수 있다.

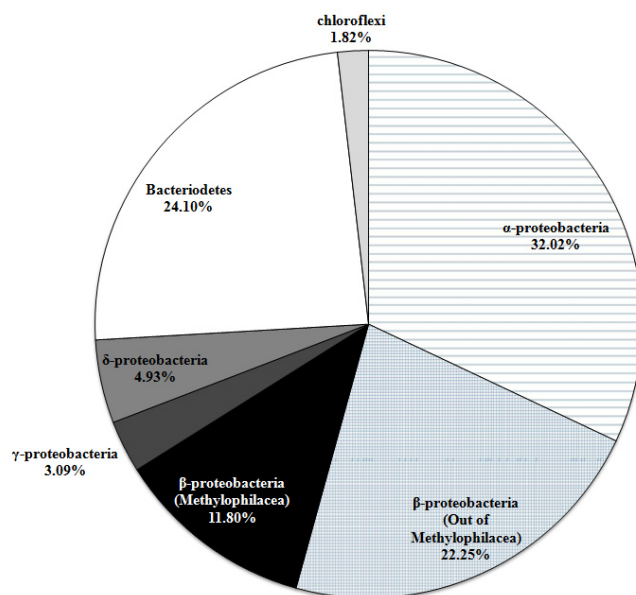
Bacterioidetes중에는 Sphingobacteriales의 *Candidatus Aquiristis calciphila*가 18.9%를 점하고 있었다.

실험단계 I에서는 매우 다양한 종들이 경쟁하고 있었으나 실험단계 II에서는 몇몇 종들로 단순해지는 경쟁이 끝난 상태다.

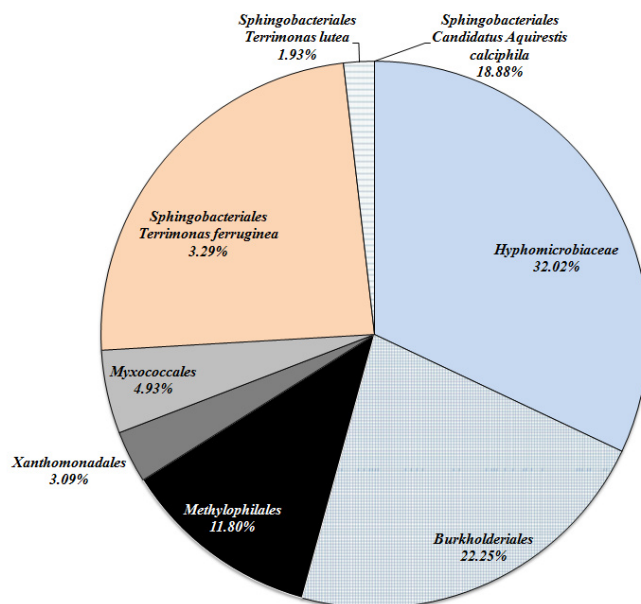
Table 5–3. Bacterial community structure of the methylotrophic denitrification consortium in phase II

Phylum	Order	Relative abund. (%)
$\alpha$ –proteobacteria	Hyphomicrobiaceae	32.02
$\beta$ –proteobacteria	Burkholderiales	22.25
	Methylophilales	11.80
$\gamma$ –proteobacteria	Xanthomonadales	3.09
$\delta$ –proteobacteria	Myxococcales	4.93
Bacteroidetes	Sphingobacteriales	24.10
chloroflexi	Anaerolineales	1.82





(phase II phylum/class level)



(phase II order level)

Fig. 5–5. Bacterial community structure of the methylotrophic denitrification consortium on phylum/class levels and order level in phase II

### 5.2.1.3. 실험단계 III

Proteobacteria내 미생물군집은  $\alpha$ -proteobacteria가 8.3%,  $\beta$ -proteobacteria가 50.0%로 우점을 보이고 있음을 알 수 있다(Table 5-4; Fig. 5-6).

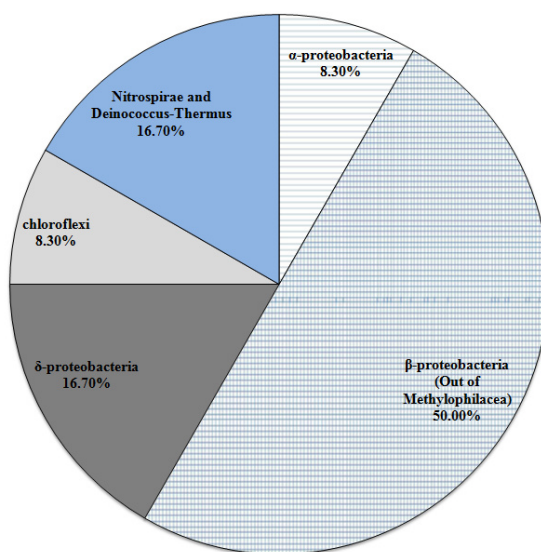
$\alpha$ -proteobacteria에는 Hyphomicrobiaceae가 8.3%,  $\beta$ -proteobacteria에 속하는 Burkholderiales 50.0%로 전체적으로 가장 높은 우점도를 보이고 있다. 또한 Myxococcales 16.7%, Anaerolineales 8.3%, Nitrospirales는 16.7%로 분석되었다.

$\alpha$ -proteobacteria내 *Hyphomicrobium facile subsp. Facile*가 8.3%, Burkholderiales중에 *Curvibacter delicatus* 종이 25.0%로 전체 종중에 가장 우점하였으며, Methylophilales는 존재하지 않았음을 알 수 있다.

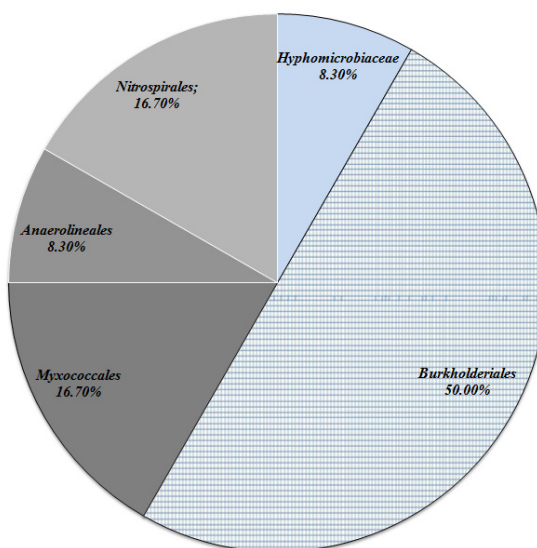
특이한 것은 Nitrospirales에 속하는 *Nitrospira defluvii*가 16.7%로 우점하고 있다. 실험단계 II에서 안정되었던 몇몇 종들이 사라지고 새로운 종들이 우점하면서 종들이 더욱 단순한 상태를 보인다.

Table 5-4. Bacterial community structure of the methylotrophic denitrification consortium in phase III

Phylum	Order	Relative abund. (%)
$\alpha$ -proteobacteria	Hyphomicrobiaceae	8.30
$\beta$ -proteobacteria	Burkholderiales	50.00
$\delta$ -proteobacteria	Myxococcales	16.70
chloroflexi	Anaerolineales	8.30
Nitrospirae and Deinococcus-Thermus	Nitrospirales	16.70



(phase III phylum/class level)



(phase III order level)

Fig. 5-6. Bacterial community structure of the methylotrophic denitrification consortium on phylum/class levels and order level in phase III

## 5.2.2. 미생물의 생화학적 특성

### 5.2.2.1. proteobacteria 그룹

#### 5.2.2.1.1. $\alpha$ -proteobacteria 그룹

가장 우점하고 있는 미생물은 *Hyphomicrobium facile subsp. facile* IFAM H-526(T)이고 모든 샘플에서 발견된 미생물이다. 이 미생물은 메탄올을 기반으로 한 탈질기능을 가지고 있다.

따라서 공정 안정화 이후에 탈질에 주요한 역할을 하는 미생물로 정의할 수 있으며 최적화에 집중해야하는 미생물이다. 또한 *Hyphomicrobium sp.*는 Halomethane류와 Methyl Sulphate, Methylated phosphate류의 C-1 Organic Carbon 물질을 처리하는 데 이용되어 왔다(Rainey, 1998; 계통학적분류도 Fig. a-1).

#### 5.2.2.1.2. $\beta$ -proteobacteria 그룹내 Methylophilales 미생물 군

메탄올을 이용하여 탈질을 수행하는 중요한 탈질 기능 미생물 군이다. Methylootrophs는 매우 다양한 미생물 군집으로 이루어져 있고 C-1 Organic Carbon을 가지는 탄소기질을 섭취하는 특성을 가지고 있다(Fig. a-2).

*Methylostenella versatilis* 유전정보에 대한 연구결과 동화적 질산환원(Assimilatory Nitrate Reduction)에 의해  $\text{NO}_3^-$ 를 환원하는 유전정보를 가지고 있다(Lapidus, 2011).  $\text{NO}_3^-$ 의 환원은 탈질과 구분되어야 하는데, *Methylostenella versatilis*는 질산으로부터 질소원을 얻기 위한 경로(Pathway)로 질산염을 암모니아로 환원시킨다. 이런 종류의 질산성질소 환원효소는 산소에 민감하지 않다(Kalyuzhnaya, M.G. et al., 2008). 이들이 최대의 우점종이 된 것은 메탄올을 이용할 수 있고,

질산을 질소원으로 활용가능하기 때문이다.

*Methylothermobacter mobilis*는 *Methylothermobacter versatilis*와 유사한 종으로써 계통분류학적으로 매우 가깝게 위치하고 있다. *Methylothermobacter mobilis*는 그러나 2009년 다시 발표한 연구결과에 의하면  $\text{NO}_3^-$ 가 존재하는 조건에서 메탄올을 이용하여 탈질반응과 함께 성장할 수 있는 것으로 밝혀졌으며 탈질 반응에 의한  $\text{N}_2\text{O}$ 의 발생이 측정되었다 (Kalyuzhnaya, 2009; 2012).

또한 Mustakhimov 등은 *Methylothermobacter mobilis*의 탈질 경로를 제시하였다(Mustakhimov, 2013). 제시한 탈질경로에 의하면 *Methylothermobacter mobilis*는  $\text{N}_2$ 를 생산하는 완벽한 형태의 탈질이 아닌  $\text{N}_2\text{O}$ 를 생산하는 불완전한 형태의 탈질을 한다.

*Methylothermobacter mobilis*에게 무산소 조건은 메탄올과 반응시 필요한 환경이지 질산성질소와 반응에 필요한 환경은 아니며, 비록 탈질이 *Methylothermobacter mobilis*에게 중요한 물질대사작용은 아니지만, 미세 산소상태(micro-aerobic conditions)에서는 탈질이 필수적인 경로다 (Beck, et al., 2011).

*Methylothermobacter mobilis*와 유사한 종류의 *Methylothermobacter* sp. 들은 성장을 위해 질산을 필요로 하며  $\text{NO}_3^-$ -N을 분해할 때 혐기성 상태를 선호하기는 하지만, 산소가 존재하는 미세산소상태(Micro aerobic condition)에서도 탈질 기능을 나타냈으며 *Methylobacillus*와 *Methylophilus* sp.가 주요한 탈질 미생물이다(Ginige et al., 2004).

#### 5.2.2.1.3. $\beta$ -proteobacteria 그룹내 Methylophilales 이외

*Curvibacter delicatus* LMG 4328(T)와 *Aquaspirillum* sp.는 탈질반응기에서 매우 흔히 발견되고 우점도가 20-30%에 이른다고 발

표한 바 있다(Thomsen, 2007; Fig. a-3).

#### 5.2.2.1.4. $\gamma$ -proteobacteria 그룹과 $\delta$ -proteobacteria 그룹

$\gamma$ -proteobacteria,  $\delta$ -proteobacteria 그룹은 전체 군집 중에 매우 소수를 차지하고 있었으며 이들에 대한 탈질 기능에 대한 연구결과는 없는 것으로 조사되었다(Fig. a-4; Fig. a-5).

#### 5.2.2.2. Bacteroidetes 문과 Chloroflexi 문

이들 중 *Candidatus Aquirestis calciphila* MS-Falk1-L은 사상균으로 생물막(Biofilm Structure)을 형성하는데 역할을 한다(Schauer et al., 2005). Chloroflexi도 대부분 사상균으로 이루어져 있고 전통적으로 무산소미생물 그라놀 구조체(Anaerobic Granule Structure)를 형성하는 미생물이다(Yamada, 2005). 이들은 생물막을 형성하는 구조체를 제공하는 중요한 미생물이다(Fig. a-6; Fig. a-7).

#### 5.2.2.3. Nitrospirae and Deinococcus-Thermus Phylum

Nitrospirae 문(Phylum)에 속하는 *Nitrospira defluvii*는 활성슬러지에서 발견되는 아질산성질소 산화미생물(NO<sub>2</sub>-Oxidizing Bacteria)이다. 이 미생물은 호기 조건에서 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>를 산화하는 기능을 가지는 미생물이므로 탈질과의 연관은 없다(Spieck et al., 2006; Fig. a-8).

#### 5.2.2.4. 그밖의 미생물

위에서 언급된 미생물 이외에도 우점도는 낮지만 *Acidovorax defluvii* BSB411(T), *Dokdonella koreensis* DS-123(T), 저온탈질균

인 *Flavobacterium limicola* ST-82(T) (Tamaki et al., 2003), *Terrimonas ferruginea* DSM 30193(T), *Terrimonas lutea* DY(T) 등 다양한 탈질 미생물이 발견되었다.

### 5.2.3. 탈질 우점균

미생물에 대한 생화학적 특징을 조사한 결과로 총 11종의 탈질 미생물을 발견하였다.

탈질미생물은 계통분류학적으로 다양하고  $\alpha$ -proteobacteria와  $\beta$ -proteobacteria에서 흔하게 발견된다(Zumft, W.G., 1997). 본 연구에서는  $\alpha$ -proteobacteria내에서는 Hyphomicrobiaceae인 *Hyphomicrobium facile* subsp. *Facile* IFAMH-526(T),  $\beta$ -proteobacteria내에서는 Burkholderiales인 *Curvibacter delicatus* LMG4328(T), *Acidovorax defluvii* BSB411(T), Methylophilales인 *Methylostenobacterium versatilis* 301(T), *Methylostenobacterium mobilis* JLW8(Tv), *Methylobacillus glycogenes* DSM5685(T), *Methylophilus flavus* Ship(T),  $\gamma$ -proteobacteria내에서는 Xanthomonadales인 *Dokdonella koreensis* DS-123(T), Bacteroidetes내에서는 Flavobacteriales인 *Flavobacterium limicola* ST-82(T), *Sphingobacteriales* (Bacteroidetes) *Terrimonas ferruginea* DSM30193(T), *Terrimonas lutea* DY(T) 등이 발견되었다. 일반 탈질미생물뿐 아니라 불완전한 탈질미생물인 Methylophilales도 탈질미생물 분류에 넣고 종별, 실험단계별 우점도를 Table 5-5로 정리하였다.

Methylophilales를 제외한 일반적인 탈질미생물은 실험단계 I

(<15℃)에 40.05%, 실험단계 II에 42.11% 그리고 실험단계 III에 41.6%의 우점도를 나타내었다. Methylophilales는 실험단계 I (<15℃)에 34.32%, 실험단계 II에 11.80% 그리고 실험단계 III에 0.00%로 나타났다.

Table 5-5. Denitrifiers and Methylophilales found in FBR

Order level (Phylum)	Species & Strain Name (OTU)	Relative abund. (%)		
		phase I	phase II	phase III
Hyphomicrobiaceae (α-proteobacteria)	<i>Hyphomicrobium facile</i> subsp. <i>Facile</i> IFAMH-526(T)*	-	32.02	8.30
Burkholderiales (β-proteobacteria)	<i>Curvibacter delicatus</i> LMG4328(T)*	18.57	1.78	25.00
	<i>Acidovorax defluvii</i> BSB411(T)*	1.41	-	8.30
Methylophilales (β-proteobacteria)	<i>Methylostenobacillus versatilis</i> 301(T)	5.74	-	-
	<i>Methylostenobacillus mobilis</i> JLW8(T)	22.89	9.48	-
	<i>Methylobacillus glycogenes</i> DSM5685(T)	1.41	-	-
	<i>Methylophilus flavus</i> Ship(T)	4.28	2.32	-
Xanthomonadales (γ-proteobacteria)	<i>Dokdonella koreensis</i> DS-123(T)*	1.41	3.09	-
Flavobacteriales (Bacteroidetes)	<i>Flavobacterium limicola</i> ST-82(T)*	4.28	-	-
Sphingobacteriales (Bacteroidetes)	<i>Terrimonas ferruginea</i> DSM30193(T)*	10.02	3.29	-
	<i>Terrimonas lutea</i> DY(T)*	4.28	1.93	-

\* Conventional denitrifiers



### 5.3. 제한인자와 탈질 우점균의 상관관계 분석

#### 5.3.1. 온도와 탈질 우점균의 상관관계

탈질미생물의 종에 따라 온도 대역별로 우점한 미생물이 존재한다. 탈질 미생물이라 하더라도 온도 대역에 따라 우점하는 미생물과 사멸하는 미생물이 있다. 이를 분석해 Table 5-6과 Fig. 5-7에 나타내었다. 실험단계 I에서 미생물 유전자분석을 위해 시료를 채취한 온도구간은 11.8~15℃였고 실험단계 II는 20.5~27.8℃였고 실험단계 III은 25.9℃였다. 실험단계 I, II는 각각 12℃ 대역과 20~25℃ 대역으로 구분할 수 있겠다.

먼저 일반 탈질미생물(Denitrifiers)과 Methylophilales를 대상으로 저온 영역 실험단계 I (<15℃)에는 우점하다가 실험단계 II, III 영역에서 존재하지 않는 탈질 미생물은 Flavobacteriales 4.28%, Methylophilales 5%, Methylophilales인 *Methylobacillus glycogenes*, *Methylostenobacillus versatilis*가 있었다.

또 12℃인 실험단계 I에는 존재하지 않았으나 20~25℃인 실험단계 II에서 우점하는 종으로 발견된 Hyphomicrobiaceae에 속하는 *Hyphomicrobium facile* subsp. *Facile*은 32%의 우점도를 나타내었다. 25.9℃이면서 유산소 조건이지만 약 12%의 탈질을 진행하고 있는 상태였다. Hyphomicrobiaceae는 실험단계 II에서 32%였던 우점도가 급격하게 줄었지만 8% 우점도로 존재하고 있었다.

Table 5–6. Relative abundance of denitrifiers and Methylophilales on temperature in each phase

Order level (Phylum)	Species & Strain Name(OTU)	(unit : %)		
		phase	phase	phase
		I	II	III
		Temperature (°C)		
		11.8~ 15.0	20.5~ 27.8	25.9
Hyphomicrobiaceae (α-proteobacteria)	<i>Hyphomicrobium facile</i> subsp. <i>Facile</i> IFAMH-526(T)*	-	32.02	8.30
Methylophilales (β-proteobacteria)	<i>Methyлотenera versatilis</i> 301(T)	5.74	-	-
	<i>Methylobacillus glycogenes</i> DSM5685(T)	1.41	-	-
Flavobacteriales (Bacterioidetes)	<i>Flavobacterium limicola</i> ST-82(T)*	4.28	-	-

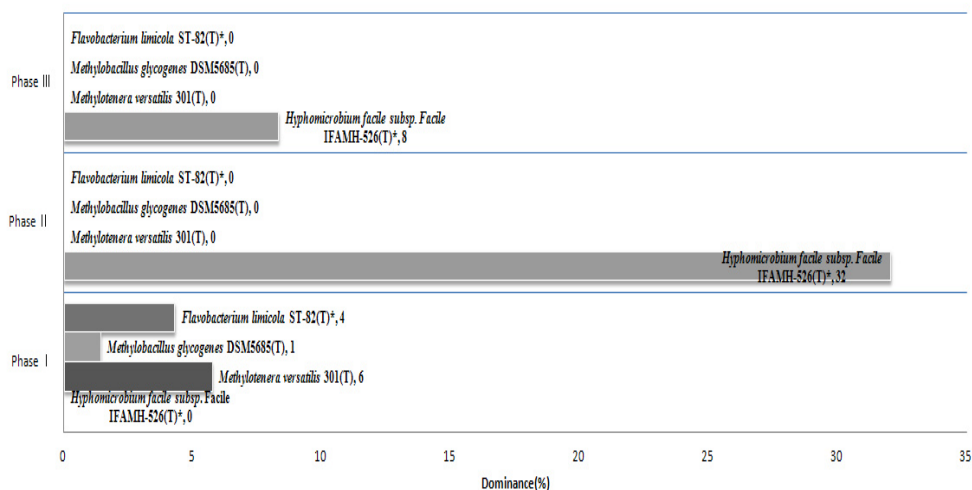


Fig. 5–7. Denitrifiers and Methylophilales to be or not on temperature in each phase

온도조건에 민감하지 않은 탈질미생물은 *Curvibacter delicatus* LMG4328(T), *Dokdonella koreensis* DS-123(T), *Terrimonas ferruginea* DSM30193(T), *Terrimonas lutea* DY(T)와 *Methylothenera mobilis*, *Methylophilus flavus* 였다.

15℃ 이하에서만 우점하는 탈질 미생물은 Methylophilales 7.1 5%로 *Methylobacillus glycogenes*와 *Methylothenera versatilis*로 구성되어 있었으며 Flavobacteriales는 4.28%였다. 또한 온도 12℃에서 발견된 저온탈질미생물인 Flavobacteriales는 4.28% 우점을 보이고 있는데 제한인자와 Methylophilales를 포함한 탈질미생물간 상호작용에 대한 정량적인 연구가 진행된다면 가장 문제가 되고 있는 탈질의 문제점인 저온에서 탈질효율이 급격하게 저하되는 문제를 해결할 수도 있으리라 생각된다.

20℃ 이상에서는  $\alpha$ -proteobacteria인 Hyphomicrobiaceae가 우점종이었다.

### 5.3.2. 용존산소와 탈질 우점균의 상관관계

메탄올을 주입하기 전 유입수의 용존산소는 각각 1.4~3.6 mg/L, 0.8~1.9 mg/L 그리고 6.0~8.0 mg/L(평균 5mg/L)였다. 탈질미생물이 우점한 상태에서 유입수의 용존산소를 분석해 보면 반응기내의 상태가 탈질미생물에 적합한 산소환경을 제공하고 있는 지 여부를 간접적으로 알 수 있다.

실험단계 I 과 실험단계 II의 용존산소 상태는 최소한 탈질미생물이 활성을 띄고 있기 때문에 무산소 상태와 0.5~0.09mg/L인 미세산소

상태가 공존하고 있음을 알 수 있다.

따라서 실험단계 I, II에는 존재했으나, 실험단계 III에서는 존재하지 않거나, 실험단계 I, II에는 존재하지 않았으나 실험단계 III에서 존재한 탈질미생물과 Methylophilales 종을 나타내었다(Table 5-7).

종별로 보면 *Dokdonella koreensis*, *Terrimonas ferruginea*, *errimonas lutea*는 실험단계 I, II에서 우점하였고 용존산소가 유입된 실험단계 III에서는 발견되지 않았다(Fig. 5-8).

Table 5-7. Relative abundance of denitrifiers and Methylophilales on influent DO in each phase

		(unit : %)		
Order level (Phylum)	Species & Strain Name(OTU)	phase I	phase II	phase III
		Influent DO(mg/L)		
		1.4~ 3.6	0.8~ 1.9	6.0~ 8.0
Methylophilales (β-proteobacteria)	<i>Methylostenella mobilis</i> JLW8(T)	22.89	9.48	-
	<i>Methylophilus flavus</i> Ship(T)	4.28	2.32	-
Xanthomonadales (γ-proteobacteria)	<i>Dokdonella koreensis</i> DS-123(T)*	1.41	3.09	-
Sphingobacteriales (Bacteroidetes)	<i>Terrimonas ferruginea</i> DSM30193(T)*	10.02	3.29	-
	<i>Terrimonas lutea</i> DY(T)*	4.28	1.93	-
Nitrospirales (Nitrospirae and Deinococcus-Ther mus)	<i>Nitrospira defluvii</i>	-	-	16.70

\* Conventional denitrifiers

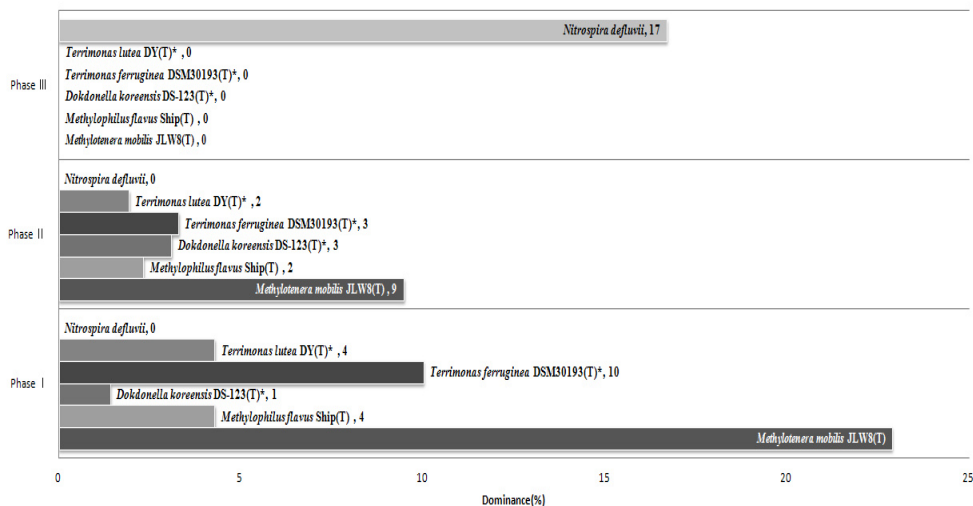


Fig. 5-8. Denitrifiers and Methylophilales to be or not on influent DO in each phase

기타 실험단계 III에서는 용존산소가 공급되어  $\text{NO}_3^-$ -N 제거율이 12%였다. 탈질이 거의 일어나지 않았지만 탈질미생물의 상대적 우점도가 41.60%에 이르는 것(Table 5-5)은 일반적인 탈질미생물이 임의 성인데다가 용존산소가 공급된 후, 시료채취까지 짧은 시간이 경과되어 아직 탈질미생물이 상당수 생존하고 있었으리라 생각된다. 또한 Nitrospirae와 Deinococcus-Thermus 문(Phylum)이 발견되었는데 이 미생물은 탈질기능이 없다. 이 미생물은 호기 조건에서  $\text{NO}_2^-$ 를 산화하는 기능을 가지는 미생물(Spieck et al., 2006)이다.

정리하면 메탈을 주입전 유입수의 용존산소가 0.8~3.6 mg/L에서 종별로 보면 *Dokdonella koreensis*, *Terrimonas ferruginea*, *errimonas lutea*와 *Methylostenora mobilis*, *Methylophilus flavus*가 우점종이었다.

산소의 침투와 전자공여체로 메탄올을 주입한 탈질반응기에서 16s rRNA분석을 통해 *Methylothermobacter* sp.와 일반적인 탈질미생물이 서로 공존하면서 각각의 니치(distinguishable niche)를 형성하고 있었다.

실험단계 I 보다 실험단계 II에서 *Methylobacillales*의 상대적 우점도가 27.17%에서 11.8%로 줄어드는 것은 유입 용존산소가 1.4~3.6 mg/L에서 0.8~1.9mg/L로 줄어드는 데서 원인을 찾을 수 있다. 또한 실험단계 III에서는 실험단계 I, II와는 달리 존재하지 않았다. 따라서 *Methylothermobacter* sp.는 미세산소환경(Micro-aerobic condition)하에서  $\text{NO}_3^-$  환원기능,  $\text{N}_2\text{O}$ 를 만드는 불완전한 탈질기능을 가지고 있는 반면 실험단계 III과 같이 용존산소가 과잉으로 존재하거나 실험단계 II을 넘어서 혐기상태로 진행되면 기능을 하지 않는 것으로 본다.

*Methylothermobacter versatilis*와 *Methylothermobacter mobilis*는 탈질반응조에서 가장 우점하거나 상당 정도로 우점하였고 이때의 탈질효율이 평균 0.8161g  $\text{NO}_3^-$ -N/g VS · d로 *Methylothermobacter* sp.가 존재하지 않는 실험단계 III의 0.1358 g  $\text{NO}_3^-$ -N/g VS · d에 비해 월등하게 높았다.

이는 유입수에 메탄올을 주입함에 있어, 유량 균등조에 주입하여 반응기 전단에서 혼합하고 반응기로 들어올 때는 완전 혼합된 상태를 만든 것이 *Methylothermobacter versatilis*, *Methylothermobacter mobilis*, *Methylobacillus glycogenes* 그리고 *Methylobacillus flavus*가 활성을 띄는 미세호기조건을 만든 것이다.

생물반응의 첫 단계는 대부분 효소의 율속단계(rate controlling step)인데 *Methylothermobacter* sp.가  $\text{NO}_3^-$ 를 탈질의 중간 반응체인  $\text{N}_2\text{O}$ 까지 빠르게 전환시키고 다른 탈질 미생물들이  $\text{N}_2$ 로 전환한다면 율속단계

를 매우 빠르게 극복할 수 있다. 불완전한 탈질기능을 하지만 메탄을 투여에 따른 탈질 기능 향상에 핵심적인 역할을 하고 있는 것이다.

이에 기반하여 세울 수 있는 가설은 메탄을 주입에 의해 *Methylothermobacter* sp.가 N<sub>2</sub>O를 효율적으로 생산하고, 이것은 전체적인 탈질 반응에서 활성화에너지(Activation Energy)를 낮추는 기능을 하게 될 것이고, 결과적으로 전체적인 탈질 반응이 일어나는 반응속도를 증가시켜주는 역할을 하게 될 것이다. 이들 *Methylothermobacter* sp.에 의한 탈질은 현재까지 관심에서 벗어나 있었다.

## 5.4. 결론

탈질미생물은 아질산성질소 환원(NiR, nitrite reductase), 산화질소 환원(NOR, nitric oxide reductase) 그리고 아산화질소 환원(N2OR, nitrous oxide reductase) 등에 관여하여 온전한 탈질과정에 참여한다.

본 연구에서 발견한 탈질 미생물은  $\alpha$ -proteobacteria내에서는 Hyphomicrobiaceae인 *Hyphomicrobium facile* subsp. *Facile* IFA MH-526(T),  $\beta$ -proteobacteria내에서는 Burkholderiales인 *Curvibacter delicatus* LMG4328(T), *Acidovorax defluvii* BSB411(T), Methylophilales인 *Methylothermobacter versatilis* 301(T), *Methylothermobacter mobilis* JLW8(Tv), *Methylobacillus glycogenes* DSM5685(T), *Methylophilus flavus* Ship(T),  $\gamma$ -proteobacteria내에서는 Xanthomonadales인 *Dokdonella koreensis* DS-123(T), Bacteroidetes내에서는 Flavobacteriales인 *Flavobacterium limicola* ST-82(T), Sphingobacter

iales(Bacterioidetes) *Terrimonas ferruginea* DSM30193(T), *Terrimonas lutea* DY(T) 등이 탈질미생물로 분류되었다.

메탈을 주입전 유입수의 용존산소가 0.8~3.6 mg/L에서 종별로 보면 *Dokdonella koreensis*, *Terrimonas ferruginea*, *errimonas lutea*와 *Methylothenera mobilis*, *Methylophilus flavus*가 우점종이었다.

온도조건에 민감하지 않은 탈질미생물은 *Curvibacter delicatus* LMG4328(T), *Dokdonella koreensis* DS-123(T), *Terrimonas ferruginea* DSM30193(T), *Terrimonas lutea* DY(T)와 *Methylothenera mobilis*, *Methylophilus flavus*였다.

15℃ 이하에서만 우점하는 탈질 미생물은 Methylophilales 7.15%로 *Methylobacillus glycogenes*, *Methylothenera versatilis*로 구성되어 있었고 Flavobacteriales는 4.28%였다. 20℃ 이상에서만 탈질을 하는 종은 *Hyphomicrobium facile* subsp. *Facile*이며 이 종은 용존산소조건에도 민감하지 않은 종이었다.

용존산소 및 온도와 관련하여 현재까지 관심에서 벗어나 있었지만 주목하여야 할 종으로는 *Methylothenera versatilis*와 *Methylothenera mobilis*가 있었다. 이들은 탈질 반응조에서 온도에 관계없이 미세산소상태에서 우점하거나 상당 정도로 우점하였고 이때의 탈질 효율이 평균 0.8161g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/g VS · d로 *Methylothenera sp.*가 존재하지 않는 실험단계 III의 0.1358 g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/g VS · d에 비해 월등하게 높았다.

자세히 보면 *Methylothenera sp.*는 실험단계 I의 용존산소 2.50±1.10 mg/L에서 27.17%의 우점을 보였고, 실험단계 II의 용존산소 1.35±0.55 mg/L에서 11.8%의 우점을 보인 것으로 보아 유입수 용



존산소 농도와 우점도가 비례함을 알 수 있다. 따라서 미세산소조건에서 질산성질소를 분해하여 온난화 물질인  $N_2O$ 를 생산하는 *Methylothermobacter* sp.만을 대상으로 용존산소와 탈질효율 그리고  $N_2O$  발생량에 대한 정량적인 연구가 필요하며 군집상태에서  $N_2O$ 가 다른 미생물에 의해 처리되는 지,  $N_2O$ 가 그대로 대기 중에 방출되는 지에 대한 연구도 필요할 것으로 사료된다.

만약 *Methylothermobacter* sp.가  $NO_3^-$ 를 탈질의 중간 반응체인  $N_2O$ 까지 빠르게 전환시키고 다른 탈질 미생물들이  $N_2O$ 로 전환한다면 율속단계를 매우 빠르게 극복해 주는 역할을 하는 것이고, 그렇지 않다면 온난화물질을 배출하는 미생물일 것이다.

## 6. 결 론

본 연구는 기존의 탈질효율을 연구하였던 공학적인 분석에 미생물 자체에 대해 연구하는 분자생물학적인 분석을 도입하여 탈질 제한요인과 탈질효율을 탈질미생물 종과 연계하여 해석하고자 하였다. 이는 환경공정의 효율을 높이하고자 하는 의도뿐 아니라 궁극적으로는 오염물질 처리자인 탈질미생물을 오염물질처리 환경과 용도에 따라 선택적이고 효율적으로 활용할 수 있는 출발점이기도 하다.

첫째, 본 연구에서 사용한 상향류식 유동상 반응기는 하수처리장에서 실규모로 운전하였기 때문에 온도를 임의로 조정할 수는 없는 상태였고 실제로 하수처리장에서 상향류식 유동상반응기 운영시 설치조건이기도 하다. 상향류식 유동상반응기에서 온도와 탈질효율간의 상관관계를 Arrhenius식으로 제시하면  $r_{D(t)} = r_{D(20)} \times 1.1651^{T-20} + 0.02$ 였다.  $r_{D(t)}$ 는 탈질효율( $\text{g NO}_3^- - \text{N/g VSS} \cdot \text{d}$ ),  $r_{D(20)}$ 는  $20^\circ\text{C}$ 에서 탈질효율,  $\theta$ 는 경험적 온도상수,  $T$ 는 온도( $^\circ\text{C}$ )이고 상향류식 유동상반응기에서 경험적 온도상수  $\theta$ 는 1.165였다.

$r_{D(20)}$ 를 본 연구의 결과값인  $1.12 \text{ NO}_3^- - \text{N/g VSS-d}$ 로 하고 비교했을 때,  $\theta$  값은 US EPA의 1.029(US EPA, 2010a)보다는 높았지만 다른 연구결과인 1.09~1.24의 사이에 있어 일반적인 탈질공정과 비교하면 중간 정도의 민감도를 나타내었다(Fig. 4-6).

또한  $15^\circ\text{C}$  이하일 때는 탈질효율이 평균  $0.39 \text{ NO}_3^- - \text{N/g VSS-d}$ ,  $20^\circ\text{C}$ 일 때는  $1.12 \text{ NO}_3^- - \text{N/g VSS-d}$ 였으므로 오염물질 유입량이 같다고 가정하면 동절기의 수리학적 체류시간을 약 2.9배 이상으

로 연장하여 운전하여야 함을 알 수 있었다.

둘째, 메탄올 주입량과 탈질효율간의 상관관계인 C/N비를 분석한 결과 최적의 주입량은 C/N비로 4.65( $\text{COD}_{\text{dosed}}/\text{NO}_3^- - \text{N}_{\text{removed}}$ )였다. 여타의 탈질공정의 최적주입량이 4.5~5.0( $\text{COD}_{\text{dosed}}/\text{NO}_3^- - \text{N}_{\text{removed}}$ )임을 감안하면 상향류식 유동상반응기가 상대적으로 작은 양의 메탄올을 주입하여도 된다는 것을 알 수 있었다.

셋째, 이전의 연구들에 의하면 반응기내에서 용존산소농도는 0.09~1 mg/L여야 한다(Table 2-4). 본 연구에서는 전처리 설비를 두지 않고도 효율적으로 운전할 수 있는 메탄올 주입 전 용존산소 상한은 1.9mg/L로 관리하여야 함을 알 수 있었다.

마지막으로 복잡한 탈질 메커니즘에서 운전조건에 따라 메탄올 이용 탈질 우점 미생물 군집 내에 존재하는 각각의 종이 어떻게 변화하는지를 파악하고, 분류하였다.

먼저 탈질 시 용존산소의 상태를 판단함에 있어 *Dokdonella koreensis*, *Terrimonas ferruginea*, *errimonas lutea*는 무산소 상태(Anaerobic condition)에 대한 지표 미생물임을 알 수 있었다. 또한 *Methylothermobacter mobilis*와 *Methylophilus flavus*는 일반적인 탈질 균들과는 달리 미세산소상태(micro-aerobic condition)에서 탈질 미생물 종임을 확인하였다.

미생물의 우점상태를 근거로 반응기 내부의 용존산소 상태를 판단해 보면 미세산소상태와 무산소상태가 공존하고 있다. 이는 생물막이 두꺼워지면 내부에 혐기상태가 생성되는 결과일 수도 있으나, 상향류식 유동상반응기는 여재의 순환으로 인하여 얇은 생물막이 계속 유지되기 때문에 물의 흐름을 Plug flow로 가정하면 반응기의 높이가 중요한 원인이다. 따라서 상향류식 유동상반응기에서는 여재층의 높이가 중요하며

본 연구에서는 2m를 적용하여 질산성질소 부하가 33 mg/L까지는 처리하는 데 문제가 없음을 확인하였다. 이후 연구에서는 유입 오염물질 부하량 별로 여재 높이와 탈질효율 간 관계를 분석할 필요가 있을 것으로 사료된다.

마지막으로 온도와 관련한 결과를 보면, 온도조건에 민감하지 않은 탈질미생물은 *Curvibacter delicatus* LMG4328(T), *Dokdonella koreensis* DS-123(T), *Terrimonas ferruginea* DSM30193(T), *Terrimonas lutea* DY(T)와 *Methylostenobacillus mobilis*, *Methylophilus flavus* 였다.

15℃ 이하에서만 우점하는 탈질 미생물은 Flavobacteriales, Methylophilales에 속하는 *Methylobacillus glycogenes*, *Methylostenobacillus versatilis*였고 20℃ 이상에서만 탈질활동을 하는 종은 *Hyphomicrobium facile* subsp. *Facile*이며 이 종은 용존산소조건에도 민감하지 않은 종이었다. 따라서 탈질 시 온도 제약조건을 극복하기 위해서는 저온 탈질미생물인 Flavobacteriales에 대한 집중적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

종합적으로 분석해 보면 용존산소 및 온도와 관련하여 현재까지 관심에서 벗어나 있었지만 주목하여야 할 종으로는 *Methylostenobacillus versatilis*와 *Methylostenobacillus mobilis*가 있었다. 이들은 탈질 반응조에서 온도에 관계없이 미세산소상태에서 우점하거나 상당 정도로 우점하였고 이때의 탈질효율이 평균 0.8161g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/g VS · d로 *Methylostenobacillus sp.*가 존재하지 않는 실험단계 III의 0.1358 g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/g VS · d에 비해 월등하게 높았다.

*Methylostenobacillus sp.*는 실험단계 I의 2.50±1.10 mg/L 용존산소 조건에서 27.17% 우점을 보이고 실험단계 II의 1.35±0.55 mg/L 용존

산소 조건에서 11.8% 우점을 보이고 있어 유입수 용존산소 농도와 우점도가 비례함을 알 수 있다. 따라서 미세산소 조건에서 질산성질소를 분해하여 온난화 물질인  $N_2O$ 를 생산하는 *Methylothermobacter* sp.만을 대상으로 용존산소와 탈질효율 그리고  $N_2O$  발생량에 대한 정량적인 연구가 필요하며 군집상태에서  $N_2O$ 가 다른 미생물에 의해 처리되는 지,  $N_2O$ 가 그대로 대기 중에 방출되는 지에 대한 연구도 필요할 것으로 사료된다.

만약 *Methylothermobacter* sp.가  $NO_3^-$ 를 탈질의 중간 반응체인  $N_2O$ 까지 빠르게 전환시키고 공생하는 다른 탈질 미생물들이  $N_2$ 로 전환한다면 율속단계를 매우 빠르게 극복해 주는 역할을 하는 것이고, 그렇지 않다면 온난화물질을 배출하기 때문에 제어해야 할 미생물이 될 것이다.

## 참 고 문 헌

녹색환경기술, 연세대학교, 2005, "고농도 산업폐수의 질소저감을 위한 물리화학적 고도처리기술 개발에 관한 연구", 환경부, pp.31-78

김동진, 김현기, 김유리, 2011, "탈질에서 질소성분 및 유기탄소 농도가  $N_2O$  배출에 미치는 영향", Clean Technology, Vol. 17(2), pp.134-141.

김인수, 광주과학기술원, 2001, "C/N비가 낮은 폐수의 질소·인 제거를 위한 황 이용 탈질공법(SPAD 공법) 적용 및 모니터링 기법개발", 환경부, p.6.

박준범, 2004, "Tidal Process를 이용한 소규모 하수처리의 효율제고를 위한 연구", 석사논문, 영남대학교 대학원, p.18.

윤조희와 이상훈, 1999, "A2O 공정을 이용한 고정생물막법에서 C/N비 변화에 따른 유기물과 질소제거 특성", J. KSEE, Vol. 21(6), pp.1037-1045.

임점호와 최우진, 2006, "외부탄소원별 전처리 방법에 따른 탈질특성에 관한 비교연구", 대한상하수도학회·한국물환경학회 2006공동 추계학술발표회 논문집, p.74.

하수도법 시행규칙 제3조 제1항 제1호 별표 1, 2012.

Araki N1, Tsukamoto Y, Nagano A, Yamaguchi T, Harada H., 2006, "Real-time PCR quantification of nitrite reductase (nirS) genes in a nitrogen removing fluidized bed reactor", Water Sci Tech. Vol. 53(6), pp.59–65.

Ahmed, A. M. and Ibrahim, A. A., 2012, "An Energy Integration Approach on UHDE Ammonia Process", World Acad. Science, Engi. Tech., Vol. 6, pp.1705–1711

An KG and JR Jones, 2000, "Temporal and spatial patterns in ionic salinity and suspended solids in a reservoir influenced by the Asian monsoon", Hydrobiol., Vol. 436, pp.179–189.

Baytshtok, V., Kim, S., Yu, R., Park, H., Chandran, K., 2008, "Molecular and Biokinetic Characterization of Methylophilic Denitrification Using Nitrate and Nitrite as Terminal Electron Acceptors", Water Sci and Tech., Vol. 58(2), pp.359–365.

Baytshtok, V., Lu, H., Park, H., Kim, S., Yu, R., Chandran, K., 2009, "Impact of varying electron donors on the molecular microbial ecology and biokinetics of methylophilic denitrifying bacteria", Biotech. Bioeng., Vol. 102, pp.1527–1536.

Beck DA1, Hendrickson EL, V. A., Wang T., Lim S., Kalyuzhnaya

MG, Lidstrom ME, Hackett M, Chistoserdova L., 2011, "An integrated proteomics/transcriptomics approach points to oxygen as the main electron sink for methanol metabolism in *Methylothermobacter mobilis*", J. Bact., Vol. 193, pp.4758–4765.

Braker, 1998, "Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (nirK and nirS) to detect denitrifying bacteria in environmental samples", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 64(10), pp.3769–3775.

Brito, A.G. and Melo, L.F., 1997, "A simplified analysis of reaction and mass transfer in UASB and EGSB reactors", Environ. Technol., Vol. 18, pp.35–44.

Bruce E. Rittman, Perry L. McCarty, 2002, "생물환경공학: 생물학적 처리와 응용", 번역 배우근, 배재호, 양지원, 한국맥그로힐, 서울, p. 548.

B.S. Moraes, T.S.O. Souza, E. Foresti, 2012, "Effect of sulphide concentration on autotrophic denitrification from nitrate and nitrite in vertical fixed-bed reactors", Proc. Biochem., Vol. 47, pp.1395–1401.

Chen, T., Zheng, P., Tang, C., Wang, S., Ding, S., 2011, "Performance of ANAMMOX–EGSB reactor", Desalination, Vol.



278, pp.281–287.

Cherchi, C., A. O. Haydern, A. Z. Gu., 2008, "Investigation of Microc<sup>TM</sup> as an Alternative Carbon Source for Denitrification", Proceedings WEF 75th ACE. Chicago, IL., p.3154

Chistoserdova, L., 2011, "Methylotrophy in a lake: from metagenomics to single-organisms physiology", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 77, pp.4705–4711.

Dawson, R. N. and Murphy, K. L., 1972, "The Temperature Dependency of Biological Denitrification", Wat. Res., Vol. 6, pp.71.

Dawson, R. N. and Murphy, K. L., 1973, "Factors Affecting Biological Denitrification of Waste Water, in Achances in Water Pollusion Research", ed. by S.H. Jenkins, Pergamon Press, London, P.671.

DeBarbadillo, C., J. Barnard, S. Tarallo, M. Steichen., 2008, "Got Carbon? Widespread Biological Nutrient Removal is Increasing the Demand for Supplemental Sources", Water Envi. Tech., Alexandria, VA: WEF, Vol. 20(1), pp.49–53.

Ding L1 and Yokota A., 2004, "Proposals of Curvibacter gracilis

gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov.", Int. J. Syst. Evol. Microbiol., Vol. 54(6), pp.2223–2230.

Dold P, Takacs I, Mokhayeri Y, Nichols A, Hinojosa J, Riffat R, Bott C, Bailey W, Murthy S. 2008, "Denitrification with carbon addition kinetic considerations", Water Environ. Res., Vol. 80(5), pp.417–427.

G. Farabegoli, R. Gavasci, F. Lombardi., 2007, "Denitrification in Tertiary Filtration: Application of an Up–Flow Filter", J. Environ. Sci. Heal., Part A, Vol. A38(10), pp.2169–2177.

Ginige, M. P., Hungenhotz, P., Daims, H., Wagner, M., Keller, J., Blackall, L.L., 2004, "Use of stable–isotope probing, full–cycle rRNA analysis, and fluorescence *in situ* hybridization–microautography to study a methanol–fed denitrifying microbial community", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 70, pp.588–596.

Glockner, A. B., Jungst, W. G. Zumft, 1993,

"Copper-containing nitrite reductase from *Pseudomonas aureofaciens* is functional in a mutationally cytochrome *cd1*-free background(NirS<sup>-</sup>) of *Pseudomonas stutzeri*", Arch. Microbiol., Vol. 160, pp.18–26.

Hallin, S. and M.Pell., 1998, "Metabolic Properties of Denitrifying Bacteria Adapting to Methanol and Ethanol in Activated Sludge", Water Res., Vol. 32(1), pp.13–18.

Hylemon, 1973, "The genus *Spirillum*: a taxonomic study", Int. J. Syst. Evol. Microbiol., Vol. 23(4), pp.340–380.

Tamaki H1, Hanada S, Kamagata Y, Nakamura K, Nomura N, Nakano K, Matsumura M., 2003, "*Flavobacterium limicola* sp. nov., a psychrophilic, organic-polymer-degrading bacterium isolated from freshwater sediments", Int. J. Syst. Evol. Microbiol., Vol. 53(Pt 2), pp.519–526.

IWA, 2006, "Advanced biological Treatment Processes for Industrial Wastewaters edited; Principles of process design for industrial wastewater treatment systems", Chapter 3.

J. Gijs Kuenen, 2008, "Anammox bacteria: from discovery to application", Nature Rev. Microbiol., Vol. 6, pp.320–326

Jennifer, J. J., Alexandra, L. H., Tahseen, I. A. S., Richard, E. G., James, V. T., 2001, "Loss of the short arm of the Y chromosome in human prostate carcinoma", *Cancer Gen. Cytogen.*, Vol. 124(2), pp.122–126.

Jeong, J., Hidaka, T., Tsuno, H., Oda, T., 2006, "Development of biological filter as tertiary treatment for effective nitrogen removal: Biological filter for tertiary treatment", *Water Res.*, Vol. 40, pp.1127–1136.

Kalyuzhnaya, 2006, "*Methylothermobacter mobilis* gen. nov., sp. nov., an obligately methylamine-utilizing bacterium within the family Methylophilaceae", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Vol. 56(12), pp.2819–2823.

Kalyuzhnaya, M.G., Lapidus, A., Ivanova, N., Copeland, A.C., McHardy, A.C., Szeto, E., Salamov, A., Grigoriev, I.V., Suci, D., Levine, S.R., Markowitz, V.M., Rounsley, I., Tringe, S.G., Bruce, D.C., Richardson, P.M., Lidstrom, M.E., Chistoserdova, L., 2008, "High-resolution metagenomics targets specific functional types in complex microbial communities", *Nature Biotech.*, Vol. 26, pp.1029–1034.

Kalyuzhnaya, 2009, "Methylophilaceae link methanol oxidation to denitrification in freshwater lake sediment as suggested by stable

isotope probing and pure culture analysis", *Envi. Microbiol. Rep.*, Vol. 1(5), pp.385–392.

Kalyuzhnaya, 2012, "Novel methylotrophic isolates from Lake Washington sediment and description of a new species in the genus *Methylothera*, *Methylothera versatilis* sp. nov.", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Vol. 63(4), pp.106–111.

Karen Alexandra Bill, 2009, "Evaluation of alternative electron donors for denitrifying moving bed biofilm reactors(MBBRs)", the degree of Master of Science, Virginia Polytechnic Institute and State of University, p.11.

Kumaraswamy, R., K. Sjollem, G. Kuenen, M. C. M. van Loosdrecht, G. Muyzer, 2006, "Nitrate. Dependent [Fe(II)EDTA] (2.) Oxidation by *Paracoccus ferrooxidans* sp nov., Isolated From A Denitrifying Bioreactor", *Syst. Appl. Microbiol.*, Vol. 29(4), pp.276–286.

Lapidus, 2011, Genomes of three methylotrophs from a single niche reveal the genetic and metabolic divergence of the methylophilaceae, *J. Bacteriol.*, Vol. 93(15), pp.3757–3764.

Lettinga, G., Hulshoff Pol, L.W., 1991, "UASB–process design for various types of wastewaters", *Water Sci. Technol.*, Vol. 24,

pp.87–107.

Littleton, H. X., G. T. Daigger, P. F. Strom, R. A. Cowan, 2003, "Simultaneous Biological Nutrient Removal: Evaluation of Autotrophic Denitrification, Heterotrophic Nitrification, and Biological Phosphorus Removal", *Water Environ. Res.*, Vol. 75, pp.138–150.

Manning, J.F., Irvin, R.L., 1985, "The biological removal of phosphorus in a sequencing batch reactor". *J. Wat. Pollut. Control. Fed.*, Vol. 57, pp.87–94.

McCarty, P. L., L. Beck, P. St. 1969, "Amant, Biological Denitrification of Wastewaters by Addition Of Organic Materials", *Proc. 24th Annual Purdue Industrial Waste Conf.*, p.1271.

Mulder, A., A.A. Graaf, L.A. Robertson, J.G. Kuenen., 1995, "Anaerobic Ammonium Oxidation Discovered in a Denitrifying Fluidized Bed Reactor", *FEMS Microbiol. Ecol.*, Vol. 16(3), pp.177–184.

Mustakhimov, 2013, "Denitrification in *Methylothermobacter mobilis*: a mutant perspective", *J. Bact.*, Vol. doi: 10.1128/JB.00069–13 (Accepted Manuscript).

Nelson L. M., Knowles, R., 1978, "Effect of Oxygen and Nitrate on Nitrogen Fixation and Denitrification by *Azospirillum Brasilense* Growth in Continuous Culture", Can. J. Microbiol., Vol. 24, p.1395.

Nicolella, C., Van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., 2000, "Wastewater treatment with particulate biofilm reactors", J. Biotech., Vol. 80, pp.1–33.

Nichols, A., J. Hinojosa, R. Riffat, P. Dold, I. Takacs, C. Bott, W. Bailey, S. Murthy, 2007, "Maximum Methanol utilizer Growth Rate Impact of Temperature on Denitrification", Proceedings of WEF 74th ACE. San Diego, CA.

Oh, J., Silverstein, J., 1999, "Oxygen inhibition of activated sludge denitrification", Water Res. Vol. 33, pp.1925–1937.

Osaka, 2006, "Identification of acetate or methanol assimilating bacteria under nitrate reducing conditions by stable–isotope probing", Micro. Ecol., Vol. 52(2), pp.253–266.

Rainey, 1998, "Phylogenetic analysis and intragenetic structure of the genus *Hyphomicrobium* and the related genus *Filomicrobium*", Int. J. Syst. Evol. Microbio., Vol. 48(3), pp.635–639.

Schauer, 2005, "Diversity and phylogenetic affiliations of morphologically conspicuous large filamentous bacteria occurring in the pelagic zones of a broad spectrum of freshwater habitats", *Appl. Environ. Microbio.*, Vol. 71(4), pp.1931–1940.

Schmidt, I., O. Sliekers, M. Schmid, E. Bock, J. Fuerst, J. G. Kuenen, M. S. M. Jetten, M. Strous, 2003, "New Concepts Of Microbial Treatment Processes for the Nitrogen Removal in Wastewater", *FEMS Microbio. Rev.*, Vol. 27, pp.481–492.

Schramm. A., 2003, "In Situ Analysis of Structure and Activity of the Nitrifying Community in Biofilms, Aggregates and Sediments", *Geomicrobiol. J.*, Vol. 20, pp.313–333.

Spieck, 2006, "Selective enrichment and molecular characterization of a previously nuncultured *Nitrospira*–like bacterium from activated sludge", *Environ. Microbio.*, Vol. 8(3), pp.405–415.

Strohmeier, A., Schroeter, I., 1993, "In Experience and Biological Filtration in Advanced Wastewater Treatment", *Proceedings of the European Water Filtration Congress, Oostende, Belgium*, Vol. 17.



T. Dalsgaard, Thamdrup, Bo, Canfield, Donald Eugene, 2005, "Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in the marine environment", Res. Microbio., Vol. 156, pp.457–464.

Tchobanoglous, G., F. L. Burton, H.D. Stensel, 2003, "Wastewater Engineering: Treatment and Reuse", New York, NY: McGraw-Hill.

Thomsen, 2007, "Ecophysiology of abundant denitrifying bacteria inactivated sludge", FEMS Microbio. Ecol., Vol. 60(3), pp.370–382.

Timmermans, P., A. Van Haute, 1983, "Denitrification with Methanol. Fundamental Study of the Growth and Denitrification Capacity of *Hyphomicrobium* sp.", Water Res., Vol. 17, pp.1249–1255.

US EPA, 2009, "Nutrient control design manual: State of technology review report", EPA/600/R-09/012, pp.33–45.

US EPA, 2010a, "Nutrient control design manual: 4. Principles of Biological Nitrogen Removal", EPA/600/R-10/100, pp.1–46.

US EPA, 2010b, "Nutrient control design manual: 6. Overview of Nitrogen and Phosphorus Removal Technologies",

EPA/600/R-10/100, pp.1-46.

Van Verseveld, H. W., A. H. Stouthamer, 1978, "Electron Transport Chain and Coupled Oxidative Phosphorylation in Methanol. Grown *Paracoccus* Denitrifications", Arch. Microbiol, Vol. 118, pp.13-20.

Veraart, A.J., 2011, Warming can boost denitrification disproportionately due to altered oxygen dynamics, PLoS ONE, Vol. 6(3), e18508.

Wheatland, A.B., Barnett, M. J., Bruce, A. M., 1959, "Some Observations on Denitrification in Rivers and Estuaries", Sewage Purif. J. Proc., p.149.

Yamada, 2005, "Diversity, localization, and physiological properties of filamentous microbes belonging to Chloroflexi subphylum I in mesophilic and thermophilic methanogenic sludge granules", Appl. Environ. Microbio., Vol. 71(11), pp.7493-7503.

Z. Ahmed, S.M. Kim. I.S. Kim. M.S. Bum, K.J. Chae, J.H. Joo, Y. S. Ok, S.E. Oh, 2012, "Nitrification and denitrification using biofilters packed with sulfur and limestone at a pilot-scale municipal wastewater treatment plant", Environ. Tech., Vol. 33, pp.7804-7811.

Zumft, W.G., 1997, "Cell biology and molecular basis of denitrification", *Microbio. Mol. Bio. Rev.*, Vol 61, pp.533–616.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Methylotroph>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Methemoglobinemia>

<http://www.eztaxon.org>

<http://www.megasoftware.net>

<http://www.mothur.org>

## Abstract

# A study on the correlation between control factors and denitrifiers in a full-scale denitrifying upflow fluidized bed reactor (FBR)

Ju Seong Kim

Department of Civil, Urban,  
and Geosystem Engineering

The Graduate School

Seoul National University

Nitrogen and phosphorus are the causative agents for the eutrophication. In addition, an excessive amount of the nitrate ( $\text{NO}_3\text{--N}$ ) in water may form a carcinogen, and that of nitrite in water may be induced with cyanosis.

To prevent phosphorus from entering the river, government focuses in phosphorus in prior to 2012. Sewage treatments have installed tertiary treatment facilities for discharging phosphorous under 0.2 mg/L.

Despite of the installation, it was issued in 2013, too.

To solve this problem of eutrophication, government has tightened the total nitrogen discharge limits to 20 mg/L or less for public wastewater treatment facilities, regardless of the season and the region in 2012. Thus, tertiary treatment processes for nitrogen are needed in public sewage treatment facilities.

The processes for nitrogen removal in wastewater treatment are commonly divided into physicochemical processes and biological treatment processes. The treatment efficiency of physicochemical processes is constant and can treat the wastewater, even if the toxic substances are in. Though the advantages of it are, the cost of electrochemical processes is expensive than the biological treatment operation, because that processes use electrical energy and chemicals, as zinc chloride and aluminum powder, etc. A lot of special knowledge is required in managing the processes, therefore the application of that is limited.

Biological nitrogen removal processes utilizing microorganisms can be divided into the heterotrophic processes and autotrophic processes. The most of sewage treatment plants in Korea have used heterotrophic

denitrification processes. Heterotrophic process is a technology for denitrification which uses facultative microorganisms with injecting an organic carbon source such as methanol, ethanol and others in anaerobic condition, after using microorganisms to oxidize ammonia to nitrate in aerobic condition.

The FBR (Fluidized Bed Reactor) have installed in over 50 sewage treatment plants in Korea, to remove total phosphorus. IF the FBRs already installed can treated T-N, as well as T-P, it would be cost saving.

In this study, the objects were to evaluate the capable of treating the T-N and to determine the optimal operating parameters for operating a FBR. For this, first, the correlation between temperature and SDNR is analyzed. Second, through the correlation analysis between the injection volume of methanol and SDNR, most suitable C/N ratio is obtained. Thirdly, from a practical standpoint, the upper limit of dissolved oxygen in the influent before methanol injection analyzed. Finally, the correlation between the changed condition in DO and T (temperature) and microorganisms was analyzed. And the dominant microorganism was determined in the changed conditions.

A pilot FBR was installed in a sewage treatment

plant. COD<sub>Mn</sub> were analyzed with the Standard Methods (APHA, AWWA and WPCF, 1995), Flow rate with the on-line Auto Meter Green Flowmeter SSM100 (SSMI, Korea), nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N) with the HACH DR890 (HACH Co, USA) and NITRATAX plus sc (HACH Co, USA, on-line automatic measuring sensor), DO with HACH sc 200TM Universal Controller (HACH Co, USA) and the temperature with the TMS (Telemetry system) data of the sewage treatment plant. In addition, molecular biological technology, 16S rRNA was used for the analysis of microbial community.

An empirical temperature constant  $\theta$  was 1.165. C/N ratio (COD<sub>dosed</sub>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N<sub>removed</sub>) on the basis of the methanol was 4.65. In addition, the upper limit of DO in the influent before methanol injection was 1.9mg/L. When DO and temperature changed, the dominant microbial species were changed. In the cross-correlation analysis, an important discovery of microbes in denitrification was *Flavobacteriales* at low temperature. Another important discovery of microbes in denitrification was *Methylothermobacter* *versatilis* and *Methylothermobacter mobilis* to do incomplete denitrification in micro-aerobic condition.

The significances of this study are summed up with

three conclusions as bellows.

The first, the technology of FBR can be applied to real wastewater treatment plant because FBR was verified at a full-scale on a real sewage plant. This reactor can supply maintenance water for streams through the improvement of effluent water quality in wastewater and sewage water treatment plant.

Second, the FBR already installed in sewage treatment facilities can remove T-N, as well as T-P. It means to increase the utilization of existing systems by extending the treatment target substance.

Third, the changes of denitrification limiting factor (DO and temperature conditions) make the changes of dominant species. The results of the cross-correlation analysis about that can focus the species which needs to be improved or cultured.

Keywords: denitrification limiting factor, Upflow fluidized bed reactor, *Flavobacteriales*, *Methylothermobacter* spp., Micro-aerobic condition

***Student ID : 99411-803***



# Appendix

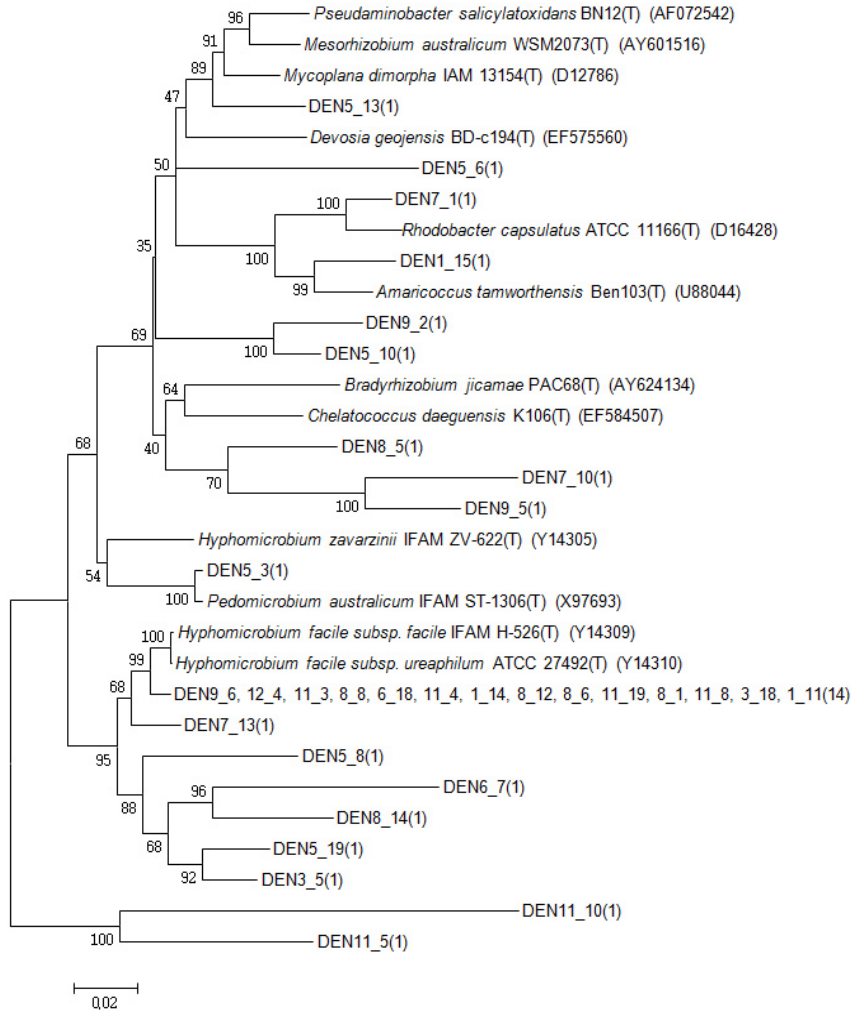


Fig. a-1. Phylogenetic tree of  $\alpha$ -proteobacteria at phase II

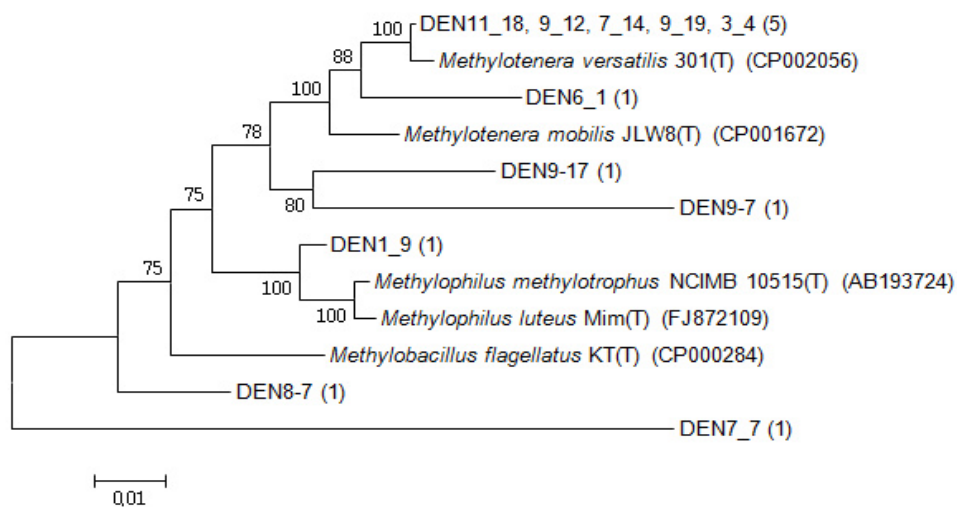


Fig. a-2. Phylogenetic tree of Methylophilales group of  $\beta$ -proteobacteria at phase II

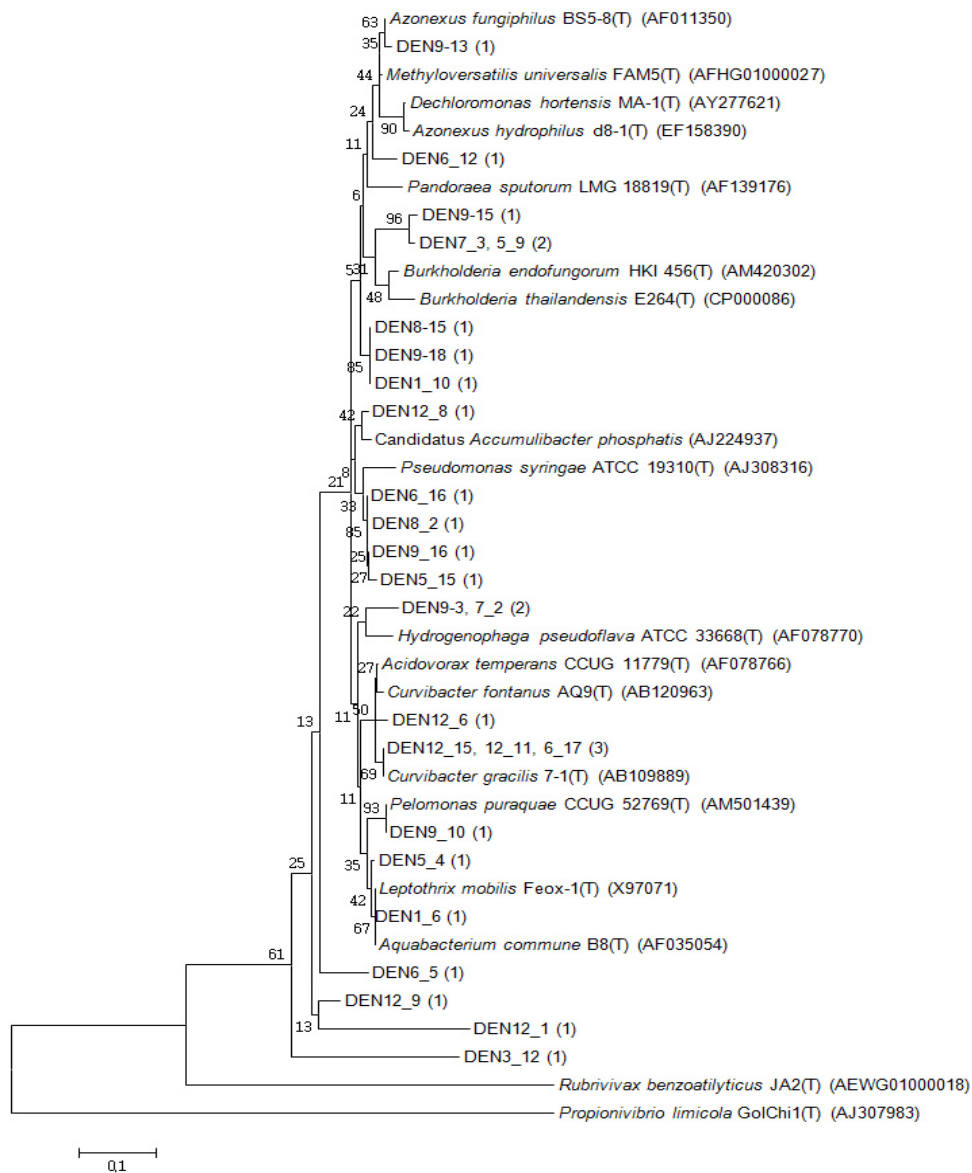


Fig. a-3. Phylogenetic tree of the group without Methylophilales in  $\beta$ -proteobacteria at phase II

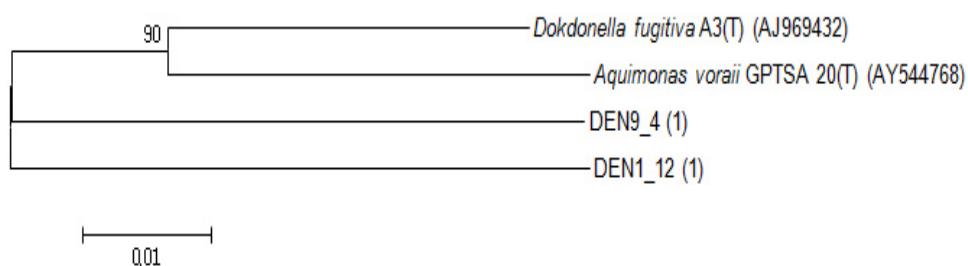


Fig. a-4. phylogenetic tree of  $\gamma$ -proteobacteria at phase II

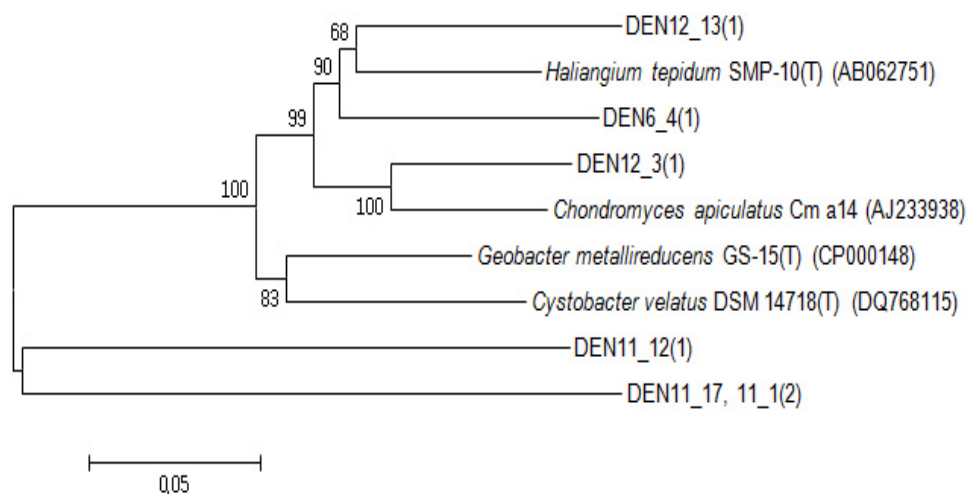


Fig. a-5. Phylogenetic tree of  $\delta$ -proteobacteria at phase II

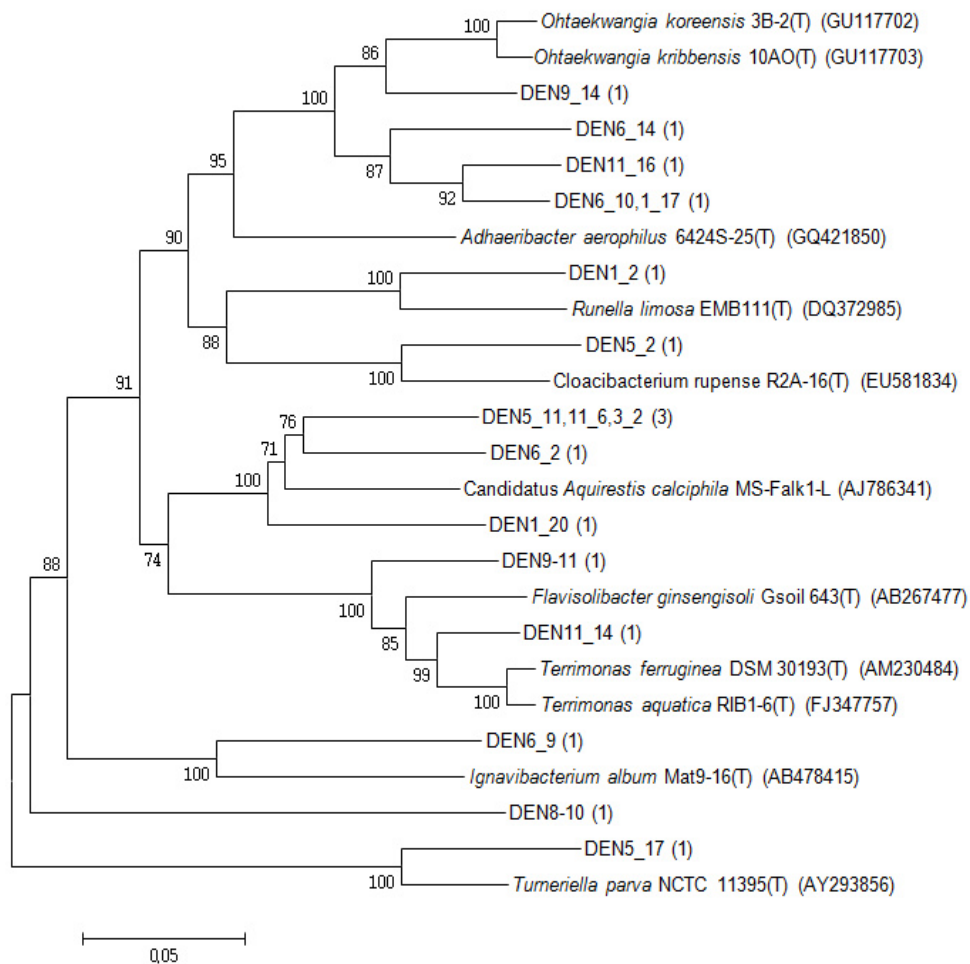


Fig. a-6. Phylogenetic tree of Bacteroidetes phylum at phase II

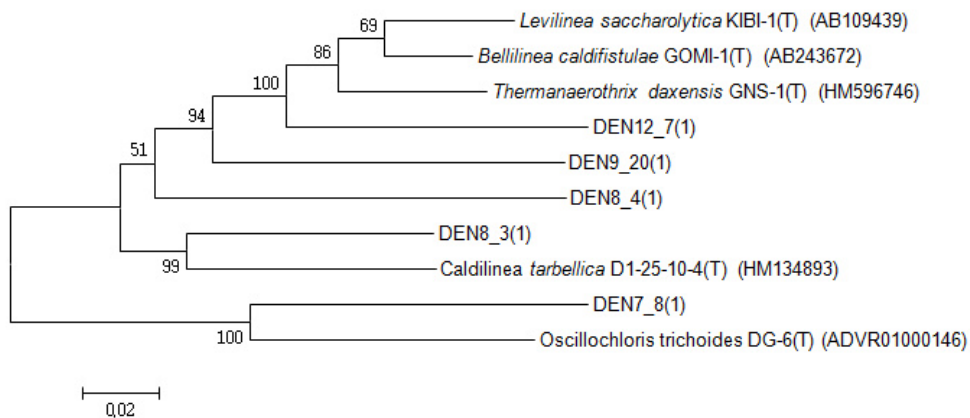


Fig. a-7. Phylogenetic tree of Chloroflexi Phylum at phase II

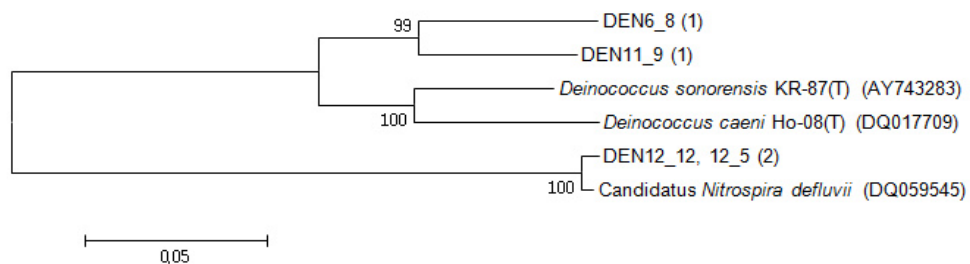


Fig. a-8. Phylogenetic tree of Nitrospirae and Deinococcus phylum at phase III